



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

**Toxicidad del insecticida fipronil en estadíos de
postlarva y alevín de “Gamitana”, *Colossoma
macropomum* (Cuvier, 1818)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Hidrobiología y Pesquería

AUTOR

Miguel Angel SALDAÑA SERRANO

ASESOR

Guillermo Odilon ÁLVAREZ BEJAR

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Saldaña, M. (2016). *Toxicidad del insecticida fipronil en estadíos de postlarva y alevín de “Gamitana”, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

616.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN HIDROBIOLOGÍA Y PESQUERÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**


14
15

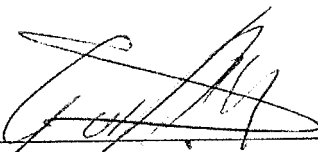
Siendo las 15:05 horas del 27 de mayo de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería de **MIGUEL ANGEL SALDAÑA SERRANO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 002-EAPCB-2016, el titulado expuso su tesis: **"TOXICIDAD DEL INSECTICIDA FIPRONIL EN ESTADIOS DE POSTLARVA Y ALEVIN DE "Gamitana", *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: sobresaliente.

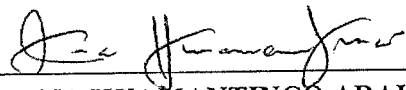
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería a **MIGUEL ANGEL SALDAÑA SERRANO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.
Siendo las 16:45 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 27 de mayo de 2016.


Mg. IRIS SAMANEZ VALER
(PRESIDENTA)


Mg. GUILLERMO ALVAREZ BEJAR
(ASESOR)


Bla. BETTY SHIGA OSHIGE
(MIEMBRO)


Dra. ANA HUAMANTINCO ARAUJO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi abuelo Pedro por su paciencia,
compresión y ayuda que me brindo
todo estos años de mi vida
¡MUCHAS GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

Ante todos, agradezco a **DIOS**, por la fuerza y la salud, que me otorgo siempre para poder desarrollar esta tesis sin mayores inconvenientes. ¡Muchas gracias Señor!

A mis padres, José y Nelly, por el apoyo incondicional y desinteresado y porque son un ejemplo de perseverancia, tenacidad, responsabilidad y éxito. ¡Los amo padres míos!

A mi hermana Carla, por ser tan sincera conmigo y brindarme su apoyo en momentos complicados.

Un agradecimiento especial a mi amigo y asesor Guillermo Álvarez, por la oportunidad que me brindó de ser su tesista, por sus sabios consejos y enseñanzas de vida, por su paciencia y apoyo incondicional que me brindo para poder concluir con este trabajo con éxito.

A mi profesora Luz Valenzuela y su esposo Máximo Quispe, por el interés que siempre mostraron por las cosas que realizaba, por la oportunidad que me brindaron, por sus acertados consejos que me sirvieron para escoger mi orientación profesional: LA ACUICULTURA.

Al profesor Alberto López responsable del proyecto “***Evaluación de la toxicidad del Fipronil (REGENT) en larvas, postlarvas y alevino-I de Colossoma macropomun “Gamitana”*** (CON-CON 2009), pues de este proyecto se desligo esta tesis de investigación. Gracias profesor por la confianza depositada en mí para realizar los bioensayos.

A mis abuelos, Pedro y Jesús, porque siempre me apoyaron en los momentos más difíciles de mi carrera, dándome tiernos y sabios consejos, ¡muchas gracias!

A mis primos Graciela y Pedro, porque compartí muchos momentos de alegría y diversión con ustedes, siempre los tengo en mi corazón.

A mis tíos y tías, Martha, Julia, “Pepe”, Lucho y José, por estar siempre pendientes de mí, y por darme siempre aliento para concluir con mis metas trazadas.

A mis padrinos, Marina y Pedro, por las palabras de aliento que siempre supieron darme, sepan que no les falle padrinos.

A los “brothers del barrio” mi primo Bruno, Ray, Harold, Ernesto, Jhon, Jean Pierre, Anthony, James y Jean Carlo, por su la amistad que siempre nos ha unido y nos unirá toda la vida, les agradezco la confianza, y las enseñanzas que aprendimos juntos en el transcurso de nuestra infancia y juventud. ¡Los quiero mucho!

A mis amigos en las buenas y en las malas, Dante, Mark y Jimmy, porque aprendí mucho de ustedes, en todo aspecto, académico y emocional, ya que estuvieron presente siempre en esta etapa de mi vida, muchas gracias por los consejos, por las diversiones juntos, fiestas y amanecidas.

A mis amigos del Laboratorio de Biología Acuática y Acuicultura, Alfredo, Juan Carlos, Yannina (¡la chata!), Giannina, Julio y Dalia, por su paciencia y enseñanzas. El DREAM TEAM.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por los magníficos conocimientos que me brindaron estos 5 años de mi vida, ¡muchas gracias!

INDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MARCO TEORICO:	3
2.1.- Los plaguicidas.....	3
2.2.- Origen y destino de los plaguicidas en los ambientes acuáticos.....	4
2.3.- El insecticida Fipronil: Características generales y propiedades físico-químicas ..	5
2.4.- Mecanismo de acción toxica del Fipronil	6
2.5.- Estudios Ecotoxicológicos	7
2.6.- Los bioensayos y las pruebas de toxicidad.....	8
2.6.1.- Tipos de pruebas de toxicidad:	9
A.- Prueba aguda:	9
a.- Prueba aguda del tipo estática:	9
b.- Prueba aguda del tipo flujo continuo:.....	10
B.- Prueba crónica:.....	10
C.- Prueba de bioestimulación:.....	10
D.- Prueba de repelencia:.....	11
E.- Prueba de bioacumulación:.....	11
F.- Pruebas preliminares o “ <i>screnning test</i> ”:	11
G.- Prueba final o definitiva:.....	11
2.7.- Peces empleados en las pruebas: “Gamitana”	11
2.7.1.- Peces en estadío de postlarva.....	14
2.7.2.- Peces en estadío de alevín.....	14
3.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS:	14
3.1.- Hipótesis Nula:	14
3.2.- Hipótesis Alterna:	15
4.- OBJETIVOS:	15
4.1.- Objetivo General:	15
4.2.- Objetivos Específicos:	15
5.- MATERIALES Y METODOS:	15
5.1.- Material biológico	15
5.1.1.- Postlarva de “Gamitana”.....	16
5.1.2.- Alevín de “Gamitana”.....	16
5.2.- Transporte, recepción y siembra de los peces	17
5.3.- Acondicionamiento y mantenimiento de los peces	18
5.4.- Pruebas de toxicidad preliminar y definitiva:.....	19
5.4.1.- Pruebas preliminares para los peces en estadío de postlarva:	19
5.4.1.1.- Primera prueba preliminar:	20
5.4.1.2.- Segunda prueba preliminar:.....	20

5.4.1.3.-Tercera prueba preliminar:.....	20
5.4.1.4.- Cuarta prueba preliminar:	20
5.4.2.- Prueba de toxicidad definitiva para el estadio de postlarva:	21
5.4.3.- Pruebas preliminares para los peces en estadio de alevín:	23
5.4.3.1.- Primera prueba preliminar:	23
5.4.3.2.- Segundo bioensayo preliminar	23
5.4.4.- Prueba de toxicidad definitiva en estadio de alevín	23
5.5.- Análisis e interpretación de resultados:	26
5.6.- Determinación de la Concentración Letal Media (CL50).....	27
5.7.- Diseño Experimental	27
5.7.1. Tratamientos:.....	27
5.7.2. Unidades Experimentales:.....	28
5.7.3. Análisis Estadísticos:.....	29
6.- RESULTADOS:	30
6.1.- Determinación de la concentración máxima no letal en el estadio de postlarva... 30	
6.1.1.- Primera prueba preliminar:	30
6.1.2.- Segunda prueba preliminar:.....	30
6.1.3.- Tercera prueba preliminar:.....	31
6.1.4.- Cuarta prueba preliminar:	31
6.2.- Determinación de la CL _{50-48h} en el estadio de postlarva.....	32
6.3.- Determinación de la concentración máxima no letal en el estadio de alevín	33
6.3.1.- Primera prueba preliminar:	33
6.3.2.- Segunda prueba preliminar:.....	33
6.4.- Determinación de la CL _{50-96h} en el estadio de alevín.....	34
6.5.- Análisis estadístico para las variables y los tratamientos:.....	35
6.6.- Parámetros físico-químicos	36
6.7.- Análisis estadístico de los parámetros físico-químicos entre los tratamientos	36
7.- DISCUSIÓN	37
8.- CONCLUSIONES	42
9.- RECOMENDACIONES	43
10.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ELECTRÓNICAS:	52
ANEXOS.....	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros físico-químicos del agua de las bolsas que contenían las larvas	18
Cuadro 2. Condiciones para la prueba final para los individuos en estadio de postlarva de "Gamitana"	22
Cuadro 3. Condiciones para la prueba final para los individuos en estadio de alevín de "Gamitana"	25
Cuadro 4. Concentraciones de Fipronil empleadas en la prueba final para postlarva ..	28
Cuadro 5. Concentraciones de Fipronil empleadas en la prueba final para alevín ..	28
Cuadro 6. Unidades experimentales durante la prueba de toxicidad final para postlarvas	29
Cuadro 7. Unidades experimentales durante la prueba de toxicidad final para alevín ..	29
Cuadro 8. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la primera prueba preliminar ..	30
Cuadro 9. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la segunda prueba preliminar ..	31
Cuadro 10. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la tercera prueba preliminar ..	31
Cuadro 11. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la cuarta prueba preliminar ..	31
Cuadro 12. Valores de mortalidad en (%) para la prueba final (t=48h) con postlarvas de <i>C. macropomum</i>	32
Cuadro 13. Valores del CL_{50-48h} para postlarvas de <i>C. macropomum</i>	33
Cuadro 14. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la primera prueba preliminar ..	33
Cuadro 15. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la segunda prueba preliminar ..	33
Cuadro 16. Valores de mortalidad en (%) para la prueba final (t=96h) con alevín de <i>C. macropomum</i>	34
Cuadro 17. Valores del LC_{50-96h} para alevín de <i>C. macropomum</i>	35
Cuadro 18. Test de Shapiro-Wilk (S-W) para los pesos y tallas de los organismos en la prueba final	35
Cuadro 19. Comparación de las mortalidades entre los tratamientos de la prueba de toxicidad para cada estadio de vida	35
Cuadro 20. Valores de los parámetros físico-químicos (t=0h y t=48h) para la prueba de toxicidad con postlarvas	36

Cuadro 21. Valores de los parámetros físico-químicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad con alevinos	36
Cuadro 22. Valores de significancia de los parámetros físico-químicos al finalizar la prueba de toxicidad con postlarvas	37
Cuadro 23. Valores de significancia de los parámetros físico-químicos al finalizar la prueba de toxicidad con alevinos	37
Cuadro 24. Valores de CL50 para diversos organismos expuestos al Fipronil.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del insecticida Fipronil	6
Figura 2. Mortalidad (%) en función de la concentración (mg.L^{-1}) de Fipronil y estimación de la $\text{CL}_{50-48\text{h}}$ para postlarvas de "Gamitana".	32
Figura 3. Mortalidad (%) en función de la concentración (mg.L^{-1}) de Fipronil y estimación de la $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para alevín de "Gamitana".	34

INDICE DE FOTOS

Foto N° 1. Organismo en estadio de postlarva de <i>C. macropomum</i>	16
Foto N° 2. Organismo en estadio de alevín de <i>C. macropomum</i>	16
Foto N° 3. Aclimatación de larvas de “Gamitana” en el laboratorio	18
Foto N° 4. Unidades experimentales empleadas en las pruebas de toxicidad aguda.....	26

RESUMEN

El Fipronil es un insecticida efectivo contra diversas plagas y causa efectos negativos en el medioambiente y la salud humana. Este insecticida es comercializado en muchos países industrializados así como en países en vías de desarrollo, por lo que, su uso a nivel mundial se viene incrementando. El objetivo del presente estudio, fue determinar el grado de letalidad del insecticida Fipronil en estadíos iniciales de vida de la “Gamitana”, *Colossoma macropomum* bajo condiciones controladas de laboratorio. Para la prueba de toxicidad con postlarvas, se evaluó en 6 concentraciones (0.00; 0.12; 0.165; 0.21; 0.255 y 0.30 mg.L⁻¹) y 4 repeticiones por un tiempo de 48 horas y para la prueba de toxicidad con alevinos, se evaluó en 6 concentraciones (0.00; 0.221; 0.276; 0.346; 0.432 y 0.54 mg.L⁻¹) y 3 repeticiones por un tiempo de 96 horas. Se determinaron valores de CL_{50-48h} (0.217mg.L⁻¹) y CL_{50-96h} (0.331mg.L⁻¹), para los estadíos de postlarva y alevín, respectivamente. Además, la máxima concentración no letal para los estadíos de postlarva y alevín fue de 0.12mg.L⁻¹ y 0.221mg.L⁻¹, respectivamente. Los peces en estadio de postlarva bajo la acción del Fipronil mostraron un comportamiento inusual, nado errático en la columna de agua, espasmos en la región del pedúnculo y aleta caudal e hiperexcitación; y los peces en estadio de alevín mostraron un acelerado movimiento opercular, nado errático en la columna de agua, espasmos en la región del pedúnculo y aleta caudal e hiperexcitación. Según los valores de CL₅₀ determinados, consideramos que el insecticida Fipronil sería “altamente tóxico” para esta especie acuática.

Palabras claves: Fipronil, insecticida, *Colossoma macropomum*, CL₅₀, nado errático, hiperexcitación.

ABSTRACT

Fipronil is an effective insecticide against various pests and cause negative effects on the environment and human health. This insecticide is sold in many industrialized countries as well as developing country, so its use worldwide has been increasing. The aim of this study was to determine the grade of lethality of the insecticide Fipronil in early stages of life "Gamitana" *C. macropomum* under controlled laboratory conditions. For toxicity test with fry, was evaluated in 6 concentrations (0.00; 0.12; 0.165; 0.21; 0.30 and 0.255 mg.L⁻¹) and 4 replicates for 48 hours and toxicity test for fingerling was evaluated in 6 concentrations (0.00; 0.221; 0.276; 0.346; 0.432 and 0.54 mg.L⁻¹) and 3 replicates for 96 hours. They were determined values of LC_{50-48h} (0.217mg.L⁻¹) and LC_{50-96h} (0.331mg.L⁻¹), for fry and fingerling stages, respectively. In addition, the maximum non-lethal concentration for fry and fingerling stages was 0.12mg.L⁻¹ and 0.221mg.L⁻¹, respectively. Fish fry stage under the action of Fipronil showed unusual behavior, erratic swimming in the water column, spasms in the region of the peduncle and caudal fin and hyperarousal; and fish fingerling stage showed an accelerated opercular movement, erratic swimming in the water column and spasms in the region of the peduncle and caudal fin and hyperarousal. According LC50 values determined, we believe that the insecticide Fipronil would be "highly toxic" to this aquatic organism.

Keywords: Fipronil, insecticide, *Colossoma macropomum*, LC50, erratic swimming, hyperarousal

1.- INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro de los distintos compartimientos ambientales (acuáticos, aéreos y terrestres) y sedimento, así como en la biota asociada y por ende, los ecosistemas. Actualmente, la Ecotoxicología disciplina que asocia la toxicología y la ecología, estudia los efectos nocivos de sustancias químicas y agentes físicos presentes en el ambiente sobre los animales (incluido el hombre), vegetales y microorganismos (Larraín, 1995). La Ecotoxicología realiza estimaciones conservadoras de los efectos potenciales de las sustancias en el medio ambiente, por medio de los bioensayos y pruebas de toxicidad. Los bioensayos y las pruebas de toxicidad se encargan de medir el efecto de los xenobióticos sobre uno o varios organismos que componen el ecosistema (Alayo, 2002) así como también, son empleados en la evaluación de los efectos de sustancias potencialmente tóxicas (Peña et al., 2001; Blaise et al., 1985).

En los últimos años, la Ecotoxicología Acuática, está consiguiendo determinar la concentración permisible del contaminante en cuerpos de agua, que no causaría daño significativo a los organismos acuáticos (Peña et al., 2001) y con estos resultados poder sugerir límites máximos permisibles (LMPs) de dicho contaminante, los cuales son empleados como herramientas para establecer parámetros de control ambiental (Alayo, 2002).

A nivel mundial, las pruebas de toxicidad y los bioensayos en especial los que emplean peces, son métodos estandarizados para el control de la calidad del agua (Varela, 2005) puesto que, los peces son sensibles a la contaminación que puede afectar sus diversas funciones vitales (Iannacone y Alvaríño, 1997).

Es por eso que, diferentes especies de peces han sido empleadas en las pruebas de toxicidad así como, en los bioensayos: *Brachydanio rerio* y *Pimephales promelas* (Razmah y Salmiya, 2004); *Oncorhynchus mykiss* (Buhl y Hamilton, 2000);

Oreochromis niloticus (Anunobi et, al. 2002); *Poecilia reticulata* y *P. vivipara* (Malagrino y Almeida, 1987); *Carassius auratus* (Tsai y McKee, 1980), demostrando diferentes niveles de sensibilidad. De esta manera, los bioensayos y las pruebas de toxicidad son herramientas útiles y sencillas para medir los posibles impactos de diferentes contaminantes (Larraín, 1995) y vienen proporcionando información valiosa para establecer y predecir el impacto potencial de contaminantes en el medio ambiente (Sánchez y Vera, 2001). La realización de bioensayos y pruebas de toxicidad que evalúen el efecto de agentes contaminantes en organismos vivos bajo condiciones de laboratorio, se han incrementado en las últimas décadas, debido a la brevedad con que se obtienen resultados y a la información que brindan sobre las dosis letales y sub-letales (CL50, CENO, CEMO) que afectan negativamente a organismos vivos en los ambientes marinos, estuarinos (Villamar, 1996) y dulceacuícolas.

De esta manera, el presente trabajo de investigación pretende evaluar la toxicidad del insecticida Fipronil en *Colossoma macropomum* “Gamitana” en condiciones controladas de laboratorio, llevando a cabo pruebas de toxicidad para determinar la Concentración Letal Media (CL50) en estadíos de postlarva y alevín, por ser las etapas más susceptibles en el ciclo de vida de esta especie frente a los contaminantes; además, serán determinados umbrales de toxicidad para dicha sustancia, con los que podremos sugerir límites máximos permisibles (LMPs) de dicho insecticida en ambientes acuáticos, y con ello recomendar estándares de calidad acuática.

2.- MARCO TEORICO:

2.1.- Los plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias de origen natural o sintético destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, así como, especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas (Cortes, 2011). Además, comprenden una variedad de moléculas con distintas propiedades que imparten diferentes grados de persistencia ambiental, movilidad y potencial tóxico, carcinogénico, mutagénico, y teratogénico o algún efecto endocrino a diversos organismos no destinatarios, inclusive el ser humano (Cella, 2009). En lo referente a los ambientes acuáticos, el creciente uso de los plaguicidas viene agravando severamente el problema de la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas a través de aguas de drenaje de suelos con agricultura intensiva, conteniendo los plaguicidas, por ejemplo, vienen siendo lanzados hacia los cuerpos de agua, provocando cambios drásticos en la composición de la biota acuática además, el deterioro de los recursos hídricos naturales puede impedir su aprovechamiento para el consumo humano (Cella, 2009).

Existe carencia de información sobre los posibles impactos que los plaguicidas pueden causar en los cuerpos de agua, pero se sabe del riesgo que el transporte de estas sustancias provenientes de cultivos agrícolas hacia áreas cercanas a cuerpos de agua pueden resultar en una acción tóxica directa o indirecta sobre organismos no destinatarios, por la alteración del hábitat o interferencia en la cadena alimenticia (Nakagome et al., 2007).

2.2.- Origen y destino de los plaguicidas en los ambientes acuáticos

Las aplicación de los plaguicidas puede ser directa en el suelo o pulverizada de manera manual y aplicada vía aérea (Hasset y Lee, 2005). En áreas agrícolas, la lixiviación de aguas superficiales y la infiltración de agua intersticial en ríos y lagos puede introducir plaguicidas en cantidades significativas, en esos cuerpos de agua (Martínez; Cólus, 2002), lo que se conoce como fuente de contaminación difusa (no-puntual) de aguas superficiales y subterráneas. Una vez en la naturaleza el plaguicida puede tener diversos destinos: ser absorbido por el suelo, permanecer disuelto en el agua, volatilizarse, ser absorbido por las raíces de las plantas o por organismos vivos, ser lixiviado o arrastrado por las aguas de las lluvias o sufrir descomposición química o biológica (Dores, 2005). El arrastre superficial puede ocurrir con el plaguicida disuelto en agua asociado al material en suspensión en el agua o ambos. El movimiento superficial del agua comienza cuando la intensidad de la lluvia excede la tasa de infiltración (Leonard, 1989). Según Brown et al (1995), del total de plaguicidas aplicados en el campo solo se pierde un pequeño porcentaje por arrastre superficial, sin embargo, esta sería la principal vía a través de la cual los plaguicidas llegan a los ambientes acuáticos. En estudios realizados en varias regiones del mundo se observa que el porcentaje de los productos utilizados en la agricultura que llegan a los ambientes acuáticos es mínimo (Jury et al., 1987; Solomon et al., 1996). Sin embargo, pesticidas persistentes y con gran movilidad en el ambiente han sido detectados en aguas superficiales y subterráneas (Buser, 1990; Balinova y Mondesky, 1999). Hay interacciones continuas entre los plaguicidas, el sedimento y el agua y son influenciadas por el movimiento del agua, turbulencia y temperatura (Nimmo, 1985).

2.3.- El insecticida Fipronil: Características generales y propiedades físico-químicas

El Fipronil (Figura. 1) es una molécula química perteneciente al grupo químico de los pirazoles de segunda generación y fue desarrollado por la empresa Rhône-Poulenc Agro, en 1987 (Bobé et al., 1998), además, es el ingrediente activo de varios insecticidas agrícolas como, el REGENT 200 SC en Perú, REGENT TS en España, BLITZ en Uruguay, REGENT 800 WG en Brasil, etc., y es ampliamente utilizado por ejemplo, para el control de insectos que causan daño en los cultivos de la caña de azúcar (Carbonetto, 2004; Gómez-Manrique; Gonçalves-Machado, 2008).

El Fipronil es un insecticida de amplio espectro y efectivo contra diversas plagas de insectos, entre ellos lepidópteros y ortópteros; es así que en ambientes acuáticos, las partículas del Fipronil se transfieren del agua al sedimento de una manera muy rápida y más del 95% de partículas se han encontrado en los sedimentos después de la primera semana en la que se realiza la aplicación a los cultivos agrícolas (Bobé et, al. 1998).

Se estima que actualmente el Fipronil es aplicado a nivel mundial en 1.7 millones de hectáreas de cultivo de caña de azúcar para el control del comején, escarabajos y broca de la caña. Además, la aplicación de este insecticida es eficaz en bajas dosis para el control de una gran variedad de insectos foliares en cultivos de arroz (Balança y De Visscher, 1997), verduras y frutas (Zhao et, al. 1995; Stevens et, al. 1998), siendo utilizado también como terapéutico en veterinaria (Hainzl y Casida, 1996).

El elevado uso de este insecticida se debe a la alta eficacia en el control de insectos resistentes a los insecticidas piretroides, organofosforados y carbamatos (Bobé et, al. 1998). Debido a lo antes mencionado, es posible encontrar partículas de Fipronil en ríos, riachuelos, lagos y lagunas cercanos a las áreas aplicadas.

El nombre químico del Fipronil, de acuerdo con la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), es: **(5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil) fenil]-4-[(trifluorometil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila)**. La solubilidad del Fipronil en el agua es de 2,4 mg.L⁻¹ en pH 5.0 y 2,2 mg.L⁻¹ en pH 9.0. La vida media (hidrólisis) a 32°C a pH de 7.1 y 9.1 es de 15.6 y 11.3 días, respectivamente; en el medio acuático (aerobio) es de 14.5 días y la degradación por fotólisis en el suelo es de 34 días (USEPA, 1996). En medio acuoso, con ausencia de luz a 22 °C a pH ácido (5.5) y neutro (7.0), la degradación fue del 80% después de 100 días en las dos condiciones (Bobé et al., 1998). El aumento de temperatura de 22 a 45°C aceleró el tiempo de degradación del Fipronil de 114 para 18 horas a pH 9.0 (Bobé et al., 1998).

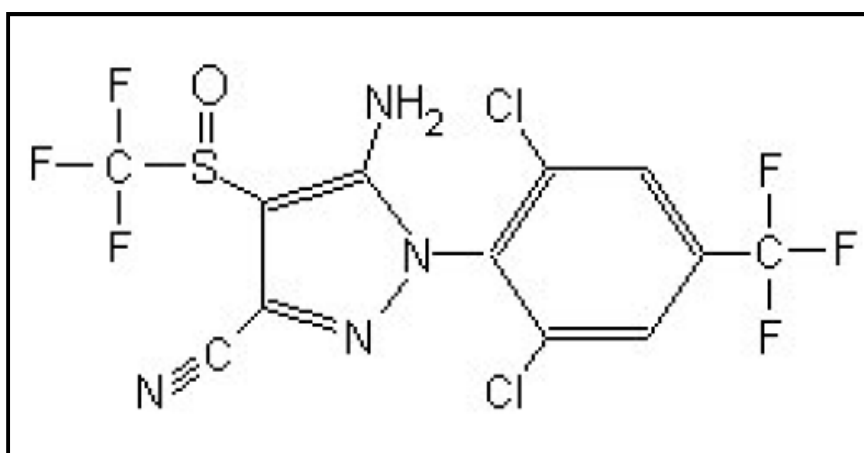


Figura 1. Estructura molecular del insecticida Fipronil

2.4.- Mecanismo de acción toxica del Fipronil

El Fipronil es una molécula extremadamente activa y tiene un potente efecto a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) de los insectos, puesto que altera los canales de cloro que son regulados por el ácido gamma aminobutírico (GABA) (Grant et, al. 1990). El Fipronil actúa directamente en el SNC de los insectos, inhibe el impulso nervioso normal y luego, bloquea la puerta de entrada de los canales de cloro de las neuronas e impide la transmisión del impulso nervioso, lo que resulta en una

actividad neural excesiva (Kidd y James, 1991). El aumento de la actividad neural causa parálisis y, consecuentemente, la muerte del insecto (Bobé et al. 1998).

2.5.- Estudios Ecotoxicológicos

Con respecto al Fipronil, existen algunos estudios del efecto que ha causado en especies de importancia comercial. De esta manera, se ha determinado que es altamente tóxico para ciertas gallináceas como la codorniz, cuya dosis letal media (DL50) es 11.3 mg.Kg^{-1} (Hamon et al. 1996); de igual forma, en lagartijas alimentadas con presas en contacto con Fipronil, se observó una alteración en la actividad locomotriz y el peso corporal (Peveling, 1997).

Además, se han reportado estudios en organismos acuáticos, por ejemplo, se observó hiperexcitación en “guppy” a 0.1 mg.L^{-1} (Gómez-Manrique, 2009); también se determinó la dosis letal aguda (DL_{50-96h}) en tilapias, siendo de $42 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (Diallo et al., 1998). Así mismo, es tóxico para una amplia variedad de invertebrados acuáticos, como camarones, ostras y otros crustáceos (Lahr et al., 1998). Stehr et al., (2006), observaron que el Fipronil durante el desarrollo de embriones y larvas de *Brachydanio rerio* expuestos a 0.033 mg.L^{-1} produce disminución en la respuesta motora, deterioro en la morfología de las fibras musculares y degeneración en la notocorda, pudiendo llegar a provocar la muerte.

La toxicidad aguda del Fipronil también ha sido evaluada en organismos no destinatarios. Por ejemplo, Chandler et al., (2004) estimaron que la concentración letal media (CL50) para el copépodo *Amphiascus tenuiremis* fue de 0.0068 mg.L^{-1} . Stark et al., (2005) determinaron la CL_{50-96h} para el microcrustáceo *Daphnia pulex*, resultando ser de 0.016 mg.L^{-1} . Por otro lado, según la *Environmental Protection Agency* (USEPA, 1996) la concentración letal media (CL50) calculada para la “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss* es de 0.248 mg.L^{-1} .

En lo que concierne a *Colossoma macropomum*, “Gamitana”, esta especie ya ha sido utilizada en algunos bioensayos y pruebas de toxicidad. Segnini et al., (2005) evaluaron el efecto del 2-cloro-2,6-bis-etilamina-S-triazina, en tejido dorsal y caudal, intestinal y renal, concluyendo que causa efectos deletéreos sobre las características morfológicas de células de estos órganos. Chávez (2006), evaluó la toxicidad aguda y crónica del fenantreno, un hidrocarburo policíclico aromático (HPA) en esta especie, además probó los efectos del hidrocarburo sobre el crecimiento y propiedades hematológicas, concluyendo a concentraciones mayores al 5% de fenantreno experimenta impactos negativos sobre su salud y sus funciones fisiológicas básicas. De la misma manera, Chapadense et al., (2009), investigaron la toxicidad de la atrazina en esta especie, determinando su CL_{50-96h} de 22 mg.L⁻¹. Además, concluyeron que este herbicida fue capaz de inducir micronúcleos en los hemocitos y el aumento de estos durante la exposición de los peces.

2.6.- Los bioensayos y las pruebas de toxicidad

Se entiende por bioensayo a pruebas en las cuales un tejido vivo, organismo o grupo de organismos son usados como indicadores para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa o de actividad desconocida (FAO, 1981; Reish y Oshida, 1987; Walker et al., 1996), permitiendo comparar la toxicidad de diferentes compuestos y conocer la sensibilidad de las diversas especies, para determinar los mecanismos de los efectos de las sustancias químicas (Alcazar, 1988).

Por otro lado, las pruebas de toxicidad permiten medir el grado o nivel de toxicidad de una sustancia química, un efluente, etc., empleando organismos vivos (Esclapés, 1999).

Por los objetivos que se han planteado en esta investigación, emplearemos el término “prueba de toxicidad” para poder explicar la metodología y los resultados de este trabajo.

2.6.1.- Tipos de pruebas de toxicidad:

A.- Prueba aguda:

Aquella que cuantifica las concentraciones letales de un tóxico o contaminante para una especie o varias especies en particular; el parámetro toxicológico más comúnmente empleado para evaluar el impacto ambiental de una sustancia es la “toxicidad aguda” (Peña et al., 2001). Las pruebas agudas, determinan la concentración de una o varias sustancias tóxicas en aguas receptoras, que producen efectos desfavorables en un organismo-prueba durante un tiempo de exposición relativamente corto, donde la mortalidad es la respuesta para este tipo de pruebas (Helfrich et al., 2009).

Los resultados se expresan en valores de Concentración Letal Media (CL50) que es la concentración tóxica que causa la muerte al 50% de los organismos-prueba (Sánchez y Vera, 2001). La CL50, ofrece información rápida sobre los efectos de la toxicidad de un determinado elemento, puesto que es una prueba de corta duración la cual debe ser específica (24, 48, 72 o 96 horas) (Goldstein et al., 1983; Morea, 1997; Oliveira, 2003).

a.- Prueba aguda del tipo estática:

Este tipo de prueba aguda se caracteriza por emplear la misma solución desde el inicio hasta el término de la exposición y es de corta duración, puesto que generalmente es de 48 o 96 horas (Sánchez y Vera, 2001).

- **Sin renovación:** Los organismos se exponen a la misma solución por un tiempo establecido de la prueba (Esclapés, 1999).

- **Con renovación:** Los organismos se someten a una nueva solución de la misma concentración inicialmente empleada ya que existe una renovación de la solución cada 24 horas (Esclapés, 1999). Tal renovación puede ser necesaria cuando las sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo (FAO, 1981). Es también conocida como pruebas de toxicidad semi-estáticas.

b.- Prueba aguda del tipo flujo continuo:

Circula de manera continua una corriente de la sustancia química o contaminante en contacto con los organismos-prueba (Esclapés, 1999). Se realiza con la renovación continua de las diluciones sometidas en la prueba con el fin de mantener constantes las concentraciones de las sustancias tóxicas activas (FAO, 1981).

B.- Prueba crónica:

Dependen de resultados de pruebas agudas, puesto que evalúan concentraciones sub-letales calculadas a partir de la CL50. Se evalúan cambios o alteraciones en los organismos, que ocurren después de una exposición a largo plazo no menor a 7 días o en el orden de la 1/10 parte de la vida media del organismo (Crites y Tchobanoglous, 2000)

C.- Prueba de bioestimulación:

Esta prueba evalúa el efecto de un tóxico sobre la producción primaria por lo que se mide la facultad de aguas residuales o de sustancias químicas de estimular la multiplicación y el desarrollo de algas unicelulares. La bioestimulación es medida ya sea por la producción en peso seco, o por el número de células por unidad de volumen (FAO, 1981).

D.- Prueba de repelencia:

Trata de medir en el laboratorio las reacciones de escapes de los animales acuáticos frente a un contaminante. Al organismo utilizado (pez o crustáceo) se le ofrece la oportunidad de elegir entre aguas contaminadas y aguas no contaminadas (FAO, 1981).

E.- Prueba de bioacumulación:

Son necesarios para las sustancias que se acumulan en las plantas y animales acuáticos; las grandes concentraciones tóxicas en los tejidos pueden causar la muerte, pero el organismo es capaz de acumular durante algún tiempo cantidades menores si sufre daños (FAO, 1981).

F.- Pruebas preliminares o “*screening test*”:

Las pruebas de toxicidad preliminares sirven para determinar el intervalo de concentraciones del tóxico que serán utilizadas en la prueba de toxicidad final o definitiva. En estas pruebas se determina la mayor concentración no letal (0,0% mortalidad) y la menor que causa 100% de muerte de los organismos-prueba (Rodríguez y Esclapés, 1995; Gómez-Manrique, 2009).

G.- Prueba final o definitiva:

La prueba de toxicidad final o definitiva es un experimento en el cual un grupo de organismos se exponen durante un período de tiempo determinado a una serie de concentraciones de un efluente o un compuesto de interés con la finalidad de determinar concentraciones letales o límites permisibles del compuesto (Esclapés, 1999).

2.7.- Peces empleados en las pruebas: “Gamitana”

La “Gamitana” ocupa la siguiente posición sistemática (Linnaeus, 1758):

Reino: ANIMALIA

Phyllum: CORDADOS

Clase: ACTINOPTERYGII

Orden: CHARACIFORMES

Família: SERRASALMIDAE

Subfamília: SERRASALMINAE

Género: *Colossoma*

Especie: *C. macropomum* (CUVIER, 1818)

El pez “Gamitana” (*Colossoma macropomum*), está ampliamente distribuido en los cuerpos de agua amazónicos, llegando a medir hasta 90 cm de longitud total, y a pesar alrededor de 30 kg, en la actualidad, ya que antes podíamos encontrar especímenes de 45 kg de peso. La superficie dorsal de su cuerpo es gris oscuro, la parte lateral es plateada y el vientre amarillo blancuzco (Goulding, 1980). La “Gamitana” tiene un amplio espectro alimenticio: algas filamentosas, partes de plantas acuáticas, zooplancton, insectos terrestres y acuáticos adultos y sus larvas, moluscos, frutas frescas y secas, semillas, frutos, y ocasionalmente come peces muchos más pequeños (Waynarovich y Waynarovich, 1998).

C. macropomum, es una especie acuícola nativa de consumo humano, de gran potencial en la piscicultura continental y de suma importancia comercial, debido a su fácil obtención, manejo y adaptación en ambientes de laboratorio, además, de poseer una amplia distribución geográfica (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

Es conocida como “tambaqui” en Brasil, “Gamitana” en Perú, “pacú” en Bolivia y “cachama negra” en Colombia está ampliamente distribuida en la Amazonía brasileña y en las cabeceras de los ríos ricos en nutrientes como el Ucayali, Maraón y Amazonas en el Perú (Araujo y Goulding, 1998). Según Goulding (1982), la “Gamitana” es el pez más importante entre los peces con escamas de la cuenca del río Amazonas y es altamente cotizado por su carne, además, es considerado como el

segundo pez más grande después del paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*) en el río Salimoes–Amazonas. Es así que, es una especie de alta importancia económica, lo que sustenta que muchos miles de pescadores artesanales brinden esta proteína animal a los habitantes de la Amazonía. Sin embargo, esta especie se está viendo afectada por la presencia de plaguicidas en su hábitat.

Es una especie sensible a una amplia variedad de compuestos tóxicos y además, existe información sobre su biología (Segnini et, al. 2005; Chávez. 2006; Chapadense et, al. 2009). Sin embargo, esta especie no está libre de ser afectada por sustancias tóxicas orgánicas e inorgánicas como los insecticidas empleados en la agricultura y que pueden llegar por escorrentía al curso de agua, afectando considerablemente la supervivencia y la calidad de vida de los organismos acuáticos y por lo tanto del ecosistema.

En la realización de las pruebas de toxicidad, los “organismos-prueba” provenientes de actividades productivas como la acuicultura, son recomendados por que presentan ventajas comparativas, con respecto a los peces de ambientes naturales, por tener la certeza que todos los organismos son de la misma cohorte y porque se tiene un control sobre los posibles patógenos que alterarían los resultados obtenidos (APHA, 1989).

Las agencias de protección ambiental como USEPA y Environment Canada recomiendan emplear postlarvas y alevinos en las pruebas de toxicidad en vista que, los peces adultos proveen poca información sobre el efecto de los contaminantes en el ambiente acuático, al existir la posibilidad de que estos ya estén adaptados a un medio adverso (Larraín, 1995; Environment Canada, 1992). Como ejemplo tenemos las pruebas de toxicidad realizadas con alevinos de “guppy” (Iannacone y Alvariño, 1997), alevinos de “trucha” (Buhl y Hamilton, 2000), post larvas de “pejerrey” (Vera et al., 2001) y alevinos de “tilapia” (Anunobi et al., 2002).

2.7.1.- Peces en estadio de postlarva

Se denominan peces en estadio de postlarva, cuando finaliza la alimentación endógena, es decir, el organismo ha consumido por completo su saco vitelino e inicia la alimentación exógena además, ya han transcurrido de 15 a 20 días de vida (post-eclosión) y el alimento exógeno que es suministrado, en su mayoría es alimento vivo (zooplancton, *Artemia*, etc.) (Woynarovich y Woynarovich, 1998). Los principales órganos como la boca, branquias, tubo digestivo, ano y vejiga natatoria no han terminado de desarrollarse completamente, la talla (longitud total) es menor a 1.5 cm. Los organismos son fusiformes, alargados y tienden a presentar una coloración transparente (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

2.7.2.- Peces en estadio de alevín

Se denominan peces en estadio de alevín, cuando aproximadamente ya han transcurrido entre 30 y 45 días de vida (post-eclosión), en su dieta ya se proporciona alimento balanceado (alimento comercial). Los principales órganos como la boca, branquias, tubo digestivo, ano y vejiga natatoria han terminado de desarrollarse. La talla (longitud total) es mayor a 1.5 cm. Los organismos tienen una forma romboide y se caracterizan por presentar una mancha negra próxima a la parte media del cuerpo y debajo de la aleta dorsal. Presentan una coloración oscura en la parte dorsal y una coloración plateada en la parte ventral (Woynarovich y Woynarovich, 1998).

3.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS:

3.1.- Hipótesis Nula:

“El insecticida Fipronil no presenta una alta toxicidad en los estadios iniciales de vida de *C. macropomum*, en condiciones controladas de laboratorio”.

3.2.- Hipótesis Alterna:

“El insecticida Fipronil presenta una alta toxicidad en los estadíos iniciales de vida de *C. macropomum*, en condiciones controladas de laboratorio”.

4.- OBJETIVOS:

4.1.- Objetivo General:

Determinar el grado de letalidad del insecticida Fipronil en estadíos iniciales de vida de la “Gamitana”, *Colossoma macropomum* en condiciones controladas de laboratorio.

4.2.- Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración máxima no letal del Fipronil, en estadíos de postlarva y alevín de “Gamitana” *C. macropomum*.
- Determinar la concentración letal media (CL_{50-48h}) del Fipronil, en estadío de postlarva de “Gamitana” *C. macropomum*.
- Determinar la concentración letal media (CL_{50-96h}) del Fipronil, en estadío de alevín de “Gamitana” *C. macropomum*.

5.- MATERIALES Y METODOS:

5.1.- Material biológico

Los peces utilizados en las pruebas de toxicidad fueron obtenidos de reproductores de Gamitana por inducción hormonal, en las instalaciones del módulo de reproducción de peces del área de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Para la prueba de toxicidad final de 48 horas se emplearon individuos en estadío de postlarva y para la prueba de toxicidad final de 96 horas se emplearon individuos en estadío de alevín.

5.1.1.- Postlarva de “Gamitana”

Individuos de 20 días post-eclosión, con un peso total promedio de 1.09 ± 0.02 g y un longitud total promedio de 0.019 ± 0.007 cm.



Foto N°1. Organismo en estadio de postlarva de *C. macropomum*

5.1.2.- Alevín de “Gamitana”

Individuos de 40 días post-eclosión, con un peso total promedio de 1.68 ± 0.06 g y un longitud total promedio de 0.080 ± 0.012 cm.



Foto N° 2. Organismo en estadio de alevín de *C. macropomum*

5.2.- Transporte, recepción y siembra de los peces

El transporte de las larvas se realizó utilizando doble bolsa de polietileno de 20 cm x 30 cm de fondo cuadrado, colocadas dentro de baldes plástico de 18 litros. A las bolsas se agregó entre 4 a 6 litros de agua y el espacio restante fue llenado con oxígeno. Cada envase contenía 1.000 a 1.500 larvas/litro. Entonces, un promedio de 5000 larvas fueron colocadas en cada bolsa plástica que contenía agua saturada con oxígeno y selladas con ligas, todo ello dentro de un balde para protección de los golpes para el envío hacia la ciudad de Lima. Las larvas fueron enviadas en la empresa de transportes Bahía y el viaje duró aproximadamente 12 horas (Tingo María – Lima).

En el laboratorio de Biología Acuática y Acuicultura de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se acondicionó una pecera (volumen=150 lts) con agua blanda, temperada a 30°C y con oxigenación constante para la aclimatación. Se recogieron las larvas e inmediatamente fueron llevadas al laboratorio para proceder a la aclimatación de los organismos. La bolsa de plástico que contenía las larvas fue colocada dentro de la pecera con agua para homogenizar la temperatura del agua de la bolsa y el agua de la pecera.

Con la ayuda de un alfiler se fueron haciendo pequeños orificios en la bolsa para que no haya un cambio brusco de presión al abrir directamente la bolsa puesto que, este procedimiento podría estresar a los peces. Después de aproximadamente 30 minutos se procedió a abrir la bolsa para medir las temperaturas y constatar que sean iguales y además medir los parámetros físico-químicos con ayuda de un multiparámetro digital: nitrito (NO_2), nitrato (NO_3), amoníaco (NH_3), amonio (NH_4), pH, dureza y oxígeno disuelto del agua de donde provenían las larvas.

Se procedió a mezclar lentamente el agua del interior de la bolsa con el agua de la pecera, mientras tanto las larvas iban saliendo del interior de la bolsa y se

desplazaban hacia los bordes de la pecera. Aquí estuvieron aclimatándose por 1 semana.



Foto N° 3. Aclimatación de larvas de “Gamitana” en el laboratorio

Cuadro 1. Parámetros físico-químicos del agua de las bolsas que contenían las larvas

PARAMETROS FISICO-QUIMICOS	VALORES (mg.L ⁻¹)
TEMPERATURA	27 °C
OXIGENO	11.83
pH	8.00
NITRITO (NO ₂)	0
NITRATO (NO ₃)	0
AMONIO (NH ₄)	< 1.0
AMONIACO (NH ₃)	< 0.05
DUREZA	80

5.3.- Acondicionamiento y mantenimiento de los peces

Los organismos en estadio de postlarva y alevín, fueron mantenidos en peceras de 70 litros de volumen respectivamente. El agua fue del tipo blanda (40-

100mg.L.⁻¹CO₃Ca₂) en constante aireación. Los recambios de agua y el mantenimiento de las peceras se realizaron todos los días, empleando cloruro de sodio (NaCl), para quitar el sarro, hongos y bacterias de las paredes de las peceras. La temperatura del agua se mantuvo en 30±0.5 °C, controlada por un termostato.

Durante el estadio de postlarva, los organismos fueron alimentados “*ad libitum*” con nauplios de artemia, durante los primeros 10 días. La frecuencia de alimentación fue de tres veces al día: 9:00, 13:00 y 17:00 hrs. Luego de ello se procedió a la co-alimentación, reduciendo en forma gradual la ración de artemia e incrementando la ración de alimento balanceado (Álvarez et al., 2008; Vargas et al., 2008). La duración de la co-alimentación fue de 10 días luego del cual los peces pasaban al estadio de alevín, alimentándose exclusivamente con alimento extruído (PURIGAMITANA 28%) *ad libitum*. La frecuencia de alimentación fue de tres veces al día: 9:00, 13:00 y 17:00 hrs (Chu-Koo y Alván, 2006; Álvarez et al., 2008; Vargas et al., 2008).

El foto período, fue de 10h luz/14h oscuridad. Se controlaron los parámetros de pH, oxígeno disuelto (OD) y temperatura, 3 veces por semana. Los acuarios donde se aclimataron los peces, fueron limpiados todos los días, por el método del “sifoneo”, retirando los desechos orgánicos y restos de alimento no consumido. Los acuarios estuvieron provistos por piedras difusoras de aire, con la finalidad de remover el agua y generar más oxígeno disuelto.

5.4.- Pruebas de toxicidad preliminar y definitiva:

5.4.1.- Pruebas preliminares para los peces en estadio de postlarva:

La máxima concentración no letal fue determinada después de varias pruebas preliminares y confirmada en la prueba final (definitiva). Se realizaron 4 pruebas preliminares, cada uno por un lapso de 24 horas. En la primera prueba preliminar se emplearon 5 concentraciones más un control y n=5 peces/acuario. En las pruebas

siguientes se emplearon 4 concentraciones más un grupo control y 5 peces en cada acuario (n=5).

5.4.1.1.- Primera prueba preliminar:

Se emplearon las siguientes concentraciones del compuesto comercial REGENT 200SC (I.A. Fipronil = 200mg.L⁻¹): 0.00; 0.0128; 0.064; 0.32; 1.6 y 8.0 mg.L⁻¹, tomando esta última concentración como la que causa el 100% de mortalidad para luego ir disminuyendo teniendo como criterio la progresión geométrica, con una razón de 0.2.

5.4.1.2.- Segunda prueba preliminar:

Se emplearon las siguientes concentraciones de Fipronil: 0.00; 0.00256; 0.0128; 0.064 y 0.32 mg.L⁻¹, tomando esta última concentración como la que causa el 100% de mortalidad para luego ir disminuyendo teniendo como criterio la progresión geométrica, con una razón de 0.2.

5.4.1.3.-Tercera prueba preliminar:

A partir de la concentración 0.064 mg.L⁻¹, se disminuyó dos concentraciones y se aumentó una concentración teniendo como criterio la progresión geométrica, con una razón de 0.5, y se obtuvieron las siguientes concentraciones: 0.016; 0.032; 0.064; 0.128 mg.L⁻¹

5.4.1.4.- Cuarta prueba preliminar:

En la concentración de 0.12 mg.L⁻¹ se consiguió un 100% de sobrevivencia a partir de la cual se aumentó teniendo como criterio una progresión aritmética, a razón de 0.06 y se obtuvo las siguientes concentraciones: 0.12; 0.18; 0.24 y 0.30 mg.L⁻¹.

5.4.2.- Prueba de toxicidad definitiva para el estadio de postlarva:

Las soluciones de ensayo se agregaron 24 horas después de la transferencia de organismos. La solución stock se preparó diluyendo 0.1 ml del insecticida (I.A. Fipronil = 200g.L⁻¹) y enrazando a 1 litro de agua blanda, luego se homogenizó en un matraz, de esta manera la solución stock presentó una concentración de 20 mg I.A/L de Fipronil (Gómez, 2009); a partir de esta solución stock y por medio de diluciones, se prepararon las diferentes concentraciones 1 hora antes de iniciar la prueba (Ramírez y Mendoza, 2008).

Para los peces en estadio de postlarva, se tomó como dato el promedio entre 0.32 y 0.28 mg.L⁻¹ resultando 0.30 mg.L⁻¹ (mortalidad de 100%). Se tomó a este valor como un 100%, y se fue disminuyendo en criterio de progresión aritmética, con una razón de 0.045. De esta manera, los peces fueron expuestos a las concentraciones de 0.00; 0.12; 0.165; 0.21; 0.255 y 0.30 mg.L⁻¹ de Fipronil. Los acuarios para la prueba final se rotularon con etiquetas de colores, para distinguir los diferentes tratamientos del agente tóxico. Luego, los acuarios se llenaron con 3 litros de agua y se añadieron diez peces (n = 10), de peso promedio 0,019 ± 0.01 gr y longitud total promedio 1,14 ± 0.05 cm. Cada acuario fue colocado en un ambiente tipo “baño maría” dentro de peceras de 50 lts. La alimentación de los organismos fue suspendida 24 horas antes del inicio de la prueba.

Cuadro 2. Condiciones para la prueba final para los individuos en estadio de postlarva de "Gamitana"

Organismo prueba	Postlarva de "Gamitana"
Tipo de prueba	Aguda, estática sin recambio
Aireación	Sí, constante ($4.16 \pm 0.03 \text{ mg.L}^{-1}$)
Agua de dilución	Agua tratada
pH	7.87 ± 0.02
Temperatura	$29.92 \pm 0.16^{\circ}\text{C}$
Fotoperiodo	10h luz: 14 h oscuridad
Duración de la prueba	48 horas
Rango de tallas de los organismos	Rango de $1,14 \pm 0.05 \text{ cm.}$
Rango de pesos de los organismos	Rango de $0,019 \pm 0.01\text{gr.}$
Edad de los organismos de prueba	Postlarva (20 días post-eclosión)
Número de organismos por acuario	Mínimo 10
Número de repeticiones por concentración	Mínimo 4 repeticiones
Número de organismos por concentración	Mínimo 40 individuos
Número de repeticiones	4
Expresión de resultados	LC _{50-48hrs}
Alimentación	No
Concentraciones de prueba	Mínimo 5 y 1 control
Respuesta	Mortalidad
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Un 90% o más de sobrevivientes en el grupo control

5.4.3.- Pruebas preliminares para los peces en estadio de alevín:

Para los peces en estadio de alevín, la concentración máxima no letal fue determinada después de efectuar pruebas preliminares y fue confirmada con la prueba definitiva. Se realizaron 2 pruebas preliminares, cada una por un lapso de 24 horas. En todas las pruebas se emplearon 5 organismos por acuario, 5 concentraciones más un control.

5.4.3.1.- Primera prueba preliminar:

Se emplearon las siguientes concentraciones de Fipronil: 0.00; 0.16; 0.20; 0.24; 0.28 y 0.32 mg.L⁻¹, tomando esta última concentración que causa el 100% de mortalidad para luego disminuir teniendo un criterio de progresión aritmética, con una razón de 0.04. Estas concentraciones estuvieron basadas en los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad final con los peces en estadio de postlarva.

5.4.3.2.- Segundo bioensayo preliminar

Se aumentó las concentraciones, para conseguir la menor concentración que cause el 100% de mortalidad. De esta manera en la segunda prueba preliminar, se tomó una concentración mayor que fue 0.36 mg.L⁻¹, a partir de esta concentración se aumentó 2 concentraciones y se disminuyó 2 concentraciones tomando un criterio de progresión geométrica, con una razón de 0.66.

5.4.4.- Prueba de toxicidad definitiva en estadio de alevín

La solución stock se preparó diluyendo 0.1 ml del insecticida (I.A. Fipronil = 200g.L⁻¹) y enrazando a 1 litro de agua blanda, luego se homogenizó en un matraz. De esta manera la solución stock presentó una concentración de 20 mg I.A/L de Fipronil (Gómez, 2009); a partir de esta solución stock y por medio de diluciones, se

prepararon las diferentes concentraciones 1 hora antes de iniciar la prueba (Ramírez y Mendoza, 2008).

Para las pruebas de toxicidad finales con individuos en estadio de alevín, se tomó la concentración 0.54 mg.L^{-1} (mortalidad de 100%), se la multiplicó por la razón 0.20 y el resultado (con redondeo a dos decimales), fue restado de la concentración 0.54 mg.L^{-1} , obteniendo la nueva concentración 0.43 mg.L^{-1} . Así sucesivamente, se calcularon las concentraciones: 0.34; 0.27 y 0.22 mg.L^{-1} de Fipronil, y se adicionó el control (0.00 mg.L^{-1}) para la prueba de toxicidad definitiva.

Los acuarios para la prueba de toxicidad final se rotularon con etiquetas de colores, para distinguir las diferentes concentraciones del agente tóxico, luego los acuarios se llenaron con 3 litros de agua y se añadieron diez peces ($n = 10$), de peso promedio $0.080 \pm 0.012 \text{ gr}$ y longitud total promedio $1.68 \pm 0.06 \text{ cm}$. Cada acuario fue colocado en un ambiente tipo baño maría dentro de peceras de 50 litros. La alimentación de los organismos fue suspendida 24 horas antes del inicio de la prueba. Las soluciones de ensayo se agregaron 24 horas después de la transferencia de organismos.

Cuadro 3. Condiciones para la prueba final para los individuos en estadio de alevín de "Gamitana"

Organismo prueba	Alevín de "Gamitana"
Tipo de prueba	Aguda, estática sin recambio
Aireación	Sí, constante ($4.15 \pm 0.02 \text{ mg.L}^{-1}$)
Agua de dilución	Agua tratada
pH	7.89 ± 0.03
Temperatura	$30.0 \pm 0.13^{\circ}\text{C}$
Fotoperiodo	10h luz: 14 h oscuridad
Duración de la prueba	96 horas
Rango de tallas de los organismos	Rango de $1,68 \pm 0.06\text{cm}$
Rango de pesos de los organismos	Rango de $0,080 \pm 0.012\text{gr.}$
Edad de los organismos de prueba	Alevín (40 días post-eclosión)
Número de organismos por acuario	Mínimo 10
Número de repeticiones por concentración	Mínimo 3 repeticiones
Número de organismos por concentración	Mínimo 30 individuos
Número de repeticiones	3
Expresión de resultados	LC _{50-96hrs}
Alimentación	No
Concentraciones de prueba	Mínimo 5 y 1 control
Respuesta	Mortalidad
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Un 90% o más de sobrevivientes en el grupo control

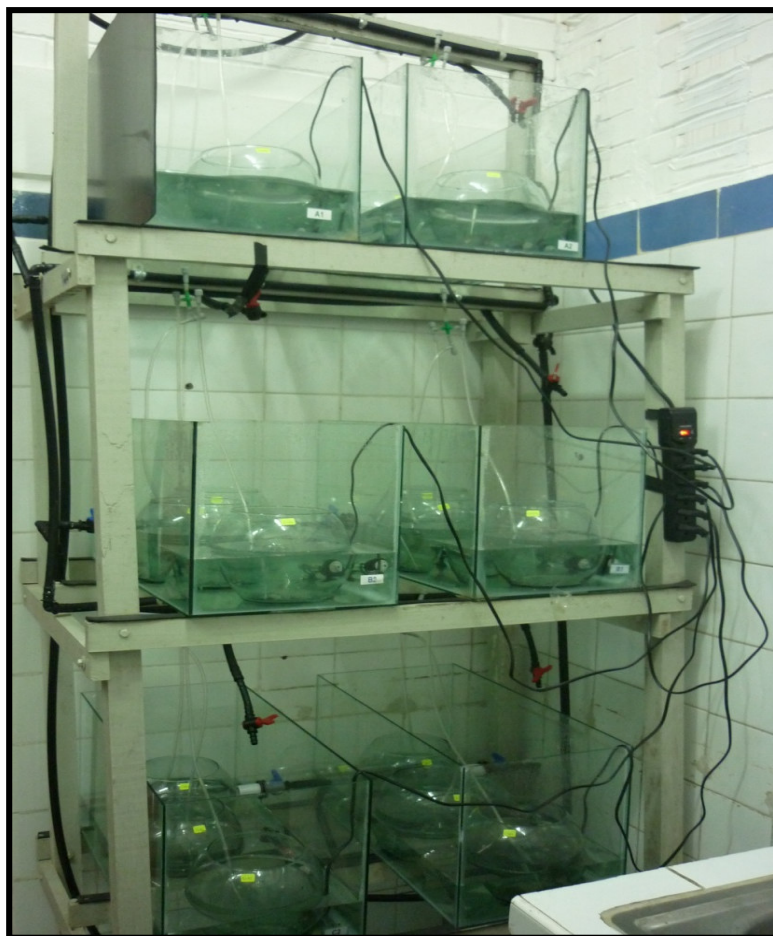


Foto N° 4. Unidades experimentales empleadas en las pruebas de toxicidad aguda

5.5.- Análisis e interpretación de resultados:

Durante la realización de las pruebas de toxicidad definitivas, fueron controlados los parámetros físico-químicos del agua al inicio y al final de la prueba. Diariamente fueron observadas y registradas las señales de intoxicación de los peces. En el caso de los peces en estadio de postlarva, se realizaron observaciones a las 6, 12, 24 y 48 horas de iniciada la prueba final; y en el caso de los peces en estadio de alevín, las observaciones fueron hechas a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96.

Las características observables evaluadas fueron: hiperexcitación, tipo de nado, localización en la columna de agua, evidencia letargo, espasmos en el

pedúnculo caudal y aleta caudal. En las primeras 6 horas de iniciada la prueba, se evaluó si las diluciones preparadas fueron las óptimas. Se retiró a diario los ejemplares muertos teniendo un registro cada 24 horas.

5.6.- Determinación de la Concentración Letal Media (CL50)

Los valores de la CL_{50-48h} estimados en las pruebas realizadas a los peces en estadio de postlarva y los valores de la CL_{50-96h} estimados en las pruebas realizadas a los peces en estadio de alevín, fueron calculados con el software **Windows 98 PROBIT (versión 1.5)** (USEPA, 1996). Este programa computarizado permite estimar la CL50 ajustando los datos de mortalidad mediante una regresión PROBIT entre una variables dependiente limitada de 0 a 1 (porcentajes de mortalidad) y una variable independiente (concentraciones del toxico evaluado) (Castillo, 2004). El PROBIT implica una transformación de las concentraciones a su logaritmo, lo cual reduce la asimetría de la distribución normal. De esta manera la curva guarda la forma sigmoidea, pero se acerca a una línea recta. Un segundo cambio es la transformación de los porcentajes de mortalidad en probits, lo cual resulta en una línea recta. Los Probits son unidades de desviación del promedio, una mortalidad de 50% significa un probit de 5 (Dueñas, 1998).

5.7.- Diseño Experimental

5.7.1. Tratamientos:

La prueba final de toxicidad con los organismos en estadio de postlarva, fue evaluada en un Diseño Completamente al Azar (DCA) empleando un factorial 6x4, es decir: 5 concentraciones (0.12; 0.165; 0.21; 0.255 y 0.30 mg.L⁻¹ de Fipronil) más un grupo control (0.00 mg.L⁻¹) y 4 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 4. Concentraciones de Fipronil empleadas en la prueba final para postlarva

TRATAMIENTOS						
FIPRONIL (mg.L ⁻¹)	CT	C1	C2	C3	C4	C5
	0.00	0.12	0.165	0.21	0.255	0.30

La prueba final de toxicidad con los organismos en estadio de alevín, fue evaluada en un Diseño Completamente al Azar (DCA) empleando un factorial 6x3, es decir: 5 concentraciones (0.22; 0.27; 0.34; 0.43 y 0.54 mg.L⁻¹ de Fipronil) más un grupo control (0.00 mg.L⁻¹) y 3 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 5. Concentraciones de Fipronil empleadas en la prueba final para alevínos

TRATAMIENTOS						
FIPRONIL (mg.L ⁻¹)	CT	C1	C2	C3	C4	C5
	0.00	0.22	0.27	0.34	0.43	0.54

5.7.2. Unidades Experimentales:

Durante la prueba de toxicidad final para los organismos en estadio de postlarva, se empleó el factorial 6 (concentraciones) x 4 (repeticiones), resultando 24 unidades experimentales (acuarios) cada una con 10 peces, haciendo un total de un “n” de 240 organismos.

Cuadro 6. Unidades experimentales durante la prueba de toxicidad final para postlarvas

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	REPETICIONES				SUB-TOTAL
	1°	2°	3°	4	
CT = 0.00	10	10	10	10	40
C1 = 0.12	10	10	10	10	40
C2 = 0.165	10	10	10	10	40
C3 = 0.21	10	10	10	10	40
C4 = 0.255	10	10	10	10	40
C5 = 0.30	10	10	10	10	40
TOTAL					n=240

Durante la prueba de toxicidad final para los organismos en estadio de alevín, se empleó el factorial 6 (concentraciones) x 3 (repeticiones), resultando 18 unidades experimentales (acuarios) cada una con 10 peces, haciendo un total de un “n” de 180 organismos.

Cuadro 7. Unidades experimentales durante la prueba de toxicidad final para alevínos

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	REPETICIONES			SUB-TOTAL
	1°	2°	3°	
CT = 0.00	10	10	10	30
C1 = 0.22	10	10	10	30
C2 = 0.27	10	10	10	30
C3 = 0.34	10	10	10	30
C4 = 0.43	10	10	10	30
C5 = 0.54	10	10	10	30
TOTAL				n=180

5.7.3. Análisis Estadísticos:

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad de *Shapiro-Wilk* (S-W) y homogeneidad de variancias de *Levene*’s. En algunos casos fue necesario realizar la transformación de los datos con $Y = \text{Log}(Y)$ (Zae, 1999). De acuerdo con los resultados de estas pruebas y para los valores paramétricos, se procedió a usar el *Análisis de Varianza* (ANOVA) y para valores no paramétricos se empleó la prueba de *Kruskal-Wallis* (K-W). En todos los casos las diferencias significativas de los resultados fueron evaluados con $p < 0.05$. Para los cálculos estadísticos inferenciales se utilizó el paquete

estadístico *STATISTIC versión 7.0* y para los gráficos se empleó el software *GRAPHPAD PRISM 5.0*.

6.- RESULTADOS:

6.1.- Determinación de la concentración máxima no letal en el estadio de postlarva

6.1.1.- Primera prueba preliminar:

El cuadro 8, nos muestra que la máxima concentración no letal sería 0.064 mg.L⁻¹ y la mínima concentración que causa el 100% de mortalidad sería 0.32 mg.L⁻¹.

Cuadro 8. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la primera prueba preliminar

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	SOBREVIVIENTES	MUERTOS	TOTAL
P1C1: 8.0	0	5	5
P1C2: 1.6	0	5	5
P1C3: 0.32	0	5	5
P1C4: 0.064	5	0	5
P1C5: 0.0128	5	0	5
P1CT: 0.00	5	0	5

6.1.2.- Segunda prueba preliminar:

El cuadro 9, nos muestra que la máxima concentración no letal sería 0.064 mg.L⁻¹ y la mínima concentración que causa el 100% de mortalidad sería 0.32 mg.L⁻¹ confirmando los resultados de la primera prueba preliminar.

Cuadro 9. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la segunda prueba preliminar

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	SOBREVIVIENTES	MUERTOS	TOTAL
P2C1: 0.32	0	5	5
P2C2: 0.064	5	0	5
P2C3: 0.0128	5	0	5
P2C4: 0.00256	5	0	5
P2CT: 0.00	5	0	5

6.1.3.- Tercera prueba preliminar:

El cuadro 10, nos muestra que la máxima concentración no letal sería 0.128 mg.L⁻¹, refutando los resultados de la primera y segunda prueba preliminar.

Cuadro 10. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la tercera prueba preliminar

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	SOBREVIVIENTES	MUERTOS	TOTAL
P3C1: 0.128	5	0	5
P3C2: 0.064	5	0	5
P3C3: 0.032	5	0	5
P3C4: 0.016	5	0	5
P3CT: 0.00	5	0	5

6.1.4.- Cuarta prueba preliminar:

Cuadro 11. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la cuarta prueba preliminar

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	SOBREVIVIENTES	MUERTOS	TOTAL
P4C1: 0.30	0	5	5
P4C2: 0.24	1	4	5
P4C3: 0.18	4	1	5
P4C4: 0.12	5	0	5
P4CT: 0.00	5	0	5

La cuarta prueba preliminar (cuadro 11), estimó que la máxima concentración no letal para el estadio de postlarva resultando ser **0.12 mg.L⁻¹**, concentración que

después sería confirmada en la prueba definitiva (cuadro 12). No hubo mortalidad en los acuarios del grupo control, por lo que se aceptan las pruebas, durante el tiempo establecido (figura 2).

6.2.- Determinación de la CL_{50-48h} en el estadio de postlarva

El valor medio de la CL_{50-48h} del Fipronil estimado para el estadio de postlarva de *C. macropomum* fue de **0.217 mg.L⁻¹**, siendo su límite de confianza inferior 0.196 mg.L⁻¹ y su límite de confianza superior 0.238 mg.L⁻¹, con un intervalo de confianza del 95% (cuadro 13). Durante la prueba de toxicidad final para este estadio, la mortalidad en el grupo control fue de 0.00%, por lo tanto la prueba puede ser considerada válida.

Cuadro 12. Valores de mortalidad en (%) para la prueba final (t=48h) con postlarvas de *C. macropomum*

	TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	Nº de peces/ tratamiento	Nº de peces muertos	(%) Mortalidad
1	PfCT: 0.00	40	0	0
2	PfC1: 0.12	40	0	0
3	PfC2: 0.165	40	3	7.5
4	PfC3: 0.21	40	14	35
5	PfC4: 0.255	40	33	82.5
6	PfC5: 0.30	40	40	100

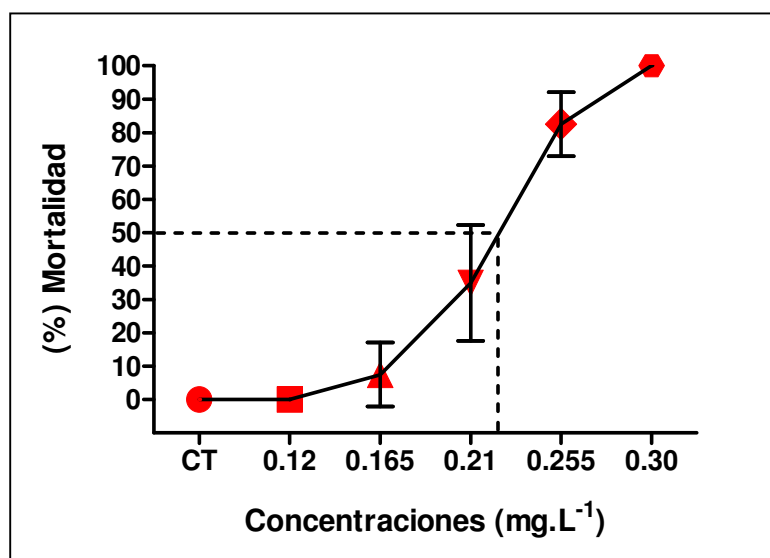


Figura 2. Mortalidad (%) en función de la concentración (mg.L⁻¹) de Fipronil y estimación de la CL_{50-48h} para postlarvas de "Gamitana".

Cuadro 13. Valores del CL_{50-48h} para postlarvas de *C. macropomum*

CL _{50-48h} (mg Fipronil.L ⁻¹)	Límites (mg Fipronil.L ⁻¹)		Ecuación (Mortalidad)	R ²
	Inferior	Superior		
0.217	0.196	0.238	y = 611.32x - 83.257	0.94

6.3.- Determinación de la concentración máxima no letal en el estadio de alevín

6.3.1.- Primera prueba preliminar:

El cuadro 14, nos muestra que la máxima concentración no letal sería 0.20 mg.L⁻¹ y no fue posible determinar la concentración que causa el 100% de mortalidad.

Cuadro 14. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la primera prueba preliminar

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	SOBREVIVIENTES	MUERTOS	TOTAL
P2C1: 0.16	5	0	5
P2C2: 0.20	5	0	5
P2C3: 0.24	4	1	5
P2C4: 0.28	4	1	5
P2C5: 0.32	3	2	5
P2CT: 0.00	5	0	5

6.3.2.- Segunda prueba preliminar:

Cuadro 15. Valores de sobrevivencia y mortalidad para la segunda prueba preliminar

TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	SOBREVIVIENTES	MUERTOS	TOTAL
P2C1: 0.16	5	0	5
P2C2: 0.24	4	1	5
P2C3: 0.36	3	2	5
P2C4: 0.54	0	5	5
P2C5: 0.81	0	5	0
P2CT: 0.00	5	0	5

La segunda prueba preliminar (cuadro 15), estimó que la máxima concentración no letal en el estadio de alevín fue de 0.16 mg.L⁻¹ sin embargo, la prueba definitiva refutaría este resultado puesto que 0.22 mg.L⁻¹ sería la concentración máxima no letal para organismos en estadio de alevín (cuadro 16). Además, la

segunda prueba preliminar, determinó que la menor concentración que causa el 100% de mortalidad fue de 0.54 mg.L⁻¹ (figura 3). No hubo mortalidad en los acuarios del grupo control, por lo que se aceptan las pruebas, durante el tiempo establecido.

6.4.- Determinación de la CL_{50-96h} en el estadio de alevín

El valor medio de la CL_{50-96h} del Fipronil estimado para el estadio de alevín de *C. macropomum* fue de **0.326 mg.L⁻¹**, siendo su límite de confianza inferior 0.292 mg.L⁻¹ y su límite de confianza superior 0.364 mg.L⁻¹, con un intervalo de confianza del 95% (cuadro 17). En los experimentos la mortalidad en el grupo control fue de 0.00%, por lo tanto la prueba puede ser considerada válida.

Cuadro 16. Valores de mortalidad en (%) para la prueba final (t=96h) con alevinos de *C. macropomum*

	TRATAMIENTOS (mg.L ⁻¹)	Nº de peces/ tratamiento	Nº de peces muertos	(%) mortalidad
1	PfCT: 0.00	30	0	0
2	PfC1: 0.22	30	0	0
3	PfC2: 0.27	30	7	23.33
4	PfC3: 0.34	30	17	56.67
5	PfC4: 0.43	30	27	90
6	PfC5: 0.54	30	30	100

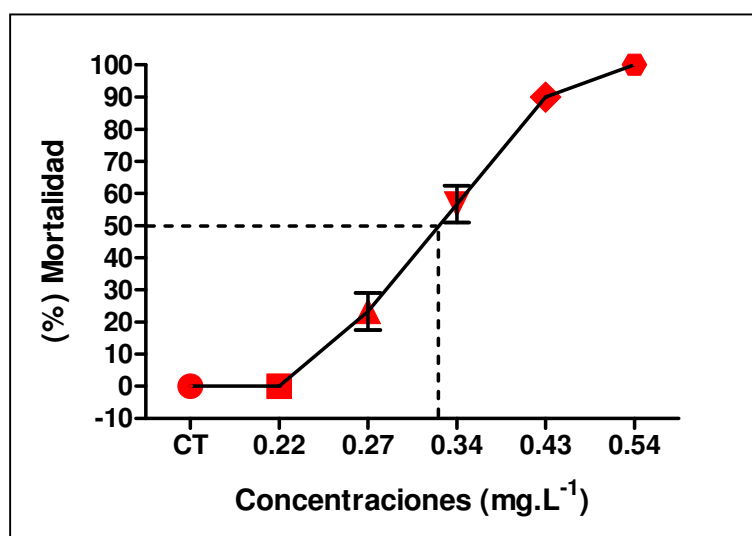


Figura 3. Mortalidad (%) en función de la concentración (mg.L⁻¹) de Fipronil y estimación de la CL_{50-96h} para alevín de "Gamitana".

Cuadro 17. Valores del LC_{50-96h} para alevinos de *C. macropomum*

CL _{50-96h} (mg Fipronil.L ⁻¹)	Limites (mg Fipronil.L ⁻¹)		Ecuación (Mortalidad)	R ²
	Inferior	Superior		
0.326	0.292	0.364	y = 319,15x - 59,753	0.93

6.5.- Análisis estadístico para las variables y los tratamientos:

Se evaluaron los datos recolectados de las biometrías tanto para las postlarvas (n=30) y alevinos (n=30) al final de cada prueba de toxicidad demostrando que no existen diferencias significativas ($p>0.05$) de los pesos (gr.) y la longitud total (cm) (cuadro 18).

Cuadro 18. Test de Shapiro-Wilk (S-W) para los pesos y tallas de los organismos en la prueba final

Test Estadístico	S-W ($p < 0.05$)	
Organismos	POSTLARVA	ALEVÍN
Peso (gr)	0.3961	0.73876
Longitud Total (cm)	0.1398	0.18353

De la misma manera, a partir de los resultados que se muestran en el cuadro 19, se pudo demostrar que durante la prueba de toxicidad tanto para postlarvas y alevinos las mortalidades medias para cada tratamiento (concentraciones de Fipronil) existe diferencias significativas ($p < 0.05$), otro criterio para aseverar que las pruebas de toxicidad realizadas en este estudio son válidas.

Cuadro 19. Comparación de las mortalidades entre los tratamientos de la prueba de toxicidad para cada estadio de vida

Test	POSTLARVA			ALEVÍN		
	Levene's	S-W	K-W	Levene's	S-W	K-W
Significancia ($p < 0.05$)	9.0047 E-08	0.00014	0.0006	0.000183	0.0043	0.0047

6.6.- Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos registrados al inicio y comparados con los registrados al finalizar cada una de las pruebas de toxicidad definitivas para postlarva y alevín, no mostraron variaciones significativas, por lo que descartamos que la mortalidad provocada durante los experimentos se haya debido a cambios bruscos de estos parámetros, ya sea durante las 48 y 96 horas de exposición (cuadros 20 y 21).

Cuadro 20. Valores de los parámetros físico-químicos (t=0h y t=48h) para la prueba de toxicidad con postlarvas

TIEMPO	°C	pH	O ₂ (mg.L ⁻¹)	NH ₄ (mg.L ⁻¹)	NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0 hora	30	7.97	4.17	< 1.0	< 0.05
48 horas	29.92 ± 0.16	7.87 ± 0.02	4.15 ± 0.02	< 1.0	< 0.05

Cuadro 21. Valores de los parámetros físico-químicos (t=0h y t=96h) para la prueba de toxicidad con alevinos

TIEMPO	°C	pH	O ₂ (mg.L ⁻¹)	NH ₄ (mg.L ⁻¹)	NH ₃ (mg.L ⁻¹)
0 hora	30.1	7.97	4.16	< 1.0	< 0.05
96 horas	30.00 ± 0.13	7.89 ± 0.03	4.15 ± 0.02	< 1.0	< 0.05

6.7.- Análisis estadístico de los parámetros físico-químicos entre los tratamientos

Se analizaron los datos de la medición de los parámetros físico-químicos tomados al finalizar de cada una de las pruebas de toxicidad tanto para las postlarvas y alevinos demostrando que no existe diferencia significativa ($p>0.05$) de la temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg.L⁻¹) y el pH (cuadros 22 y 23).

Cuadro 22. Valores de significancia de los parámetros físico-químicos al finalizar la prueba de toxicidad con postlarvas

Test	Levene's			S-W			ANOVA			K-W		
Parámetros	OD	T	pH	OD	T	pH	OD	T	pH	OD	T	pH
(<i>p</i> <0.05)	0.15	0.17	0.65	0.02	0.053	0.06	---	0.97	0.51	0.13	---	---

Cuadro 23. Valores de significancia de los parámetros físico-químicos al finalizar la prueba de toxicidad con alevinos

Test	Levene's			S-W			ANOVA			K-W		
Parámetros	OD	T	pH	OD	T	pH	OD	T	pH	OD	T	pH
(<i>p</i> <0.05)	0.01	0.33	0.10	0.40	0.12	0.25	---	0.99	0.27	0.24	---	---

7.- DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas de toxicidad pueden ser alterados por un control deficiente de los parámetros físicos como la temperatura y el oxígeno disuelto, así como de los parámetros químicos: el pH, dureza, amonio, amoníaco, nitritos y nitratos (Malagrino y Almeida, 1987). En el presente estudio los valores de temperatura y oxígeno disuelto se mantuvieron sin variaciones significativas al inicio y al final de las pruebas de toxicidad definitivas. Además, para evitar que la variación del pH del agua altere los resultados de las pruebas, no se alimentó a los peces durante el tiempo de exposición al contaminante, puesto que las heces producen la acidificación del agua o para que el toxico no se enmascare con el alimento.

Bobé *et al.*, 1998 señalan que la degradación de la molécula del Fipronil en el medio acuoso, en ausencia de luz a 22 °C y pH ácido (5.5) y neutro (7.0), es estable alrededor de 80% después de 100 días en las dos condiciones, además, nos dicen que el aumento de temperatura de 22 a 45°C disminuyó el tiempo de degradación del Fipronil de 114 para 18 horas en pH 9,0. Los valores promedio de T (°C)= 29.92 ± 0.16; pH= 7.87 ± 0.02 y T (°C)= 30.00 ± 0.13; pH= 7.89 ± 0.03, para las pruebas de

toxicidad con postlarva y alevín respectivamente, registrados en este estudio, estarían dentro de los límites establecidos por el autor antes mencionado, para decir que la degradación del Fipronil en este estudio, fue estable durante el tiempo que duraron las pruebas de toxicidad realizadas a los individuos en los estadíos de postlarva y alevín.

Agencias de protección ambiental como USEPA y Environment Canadá recomiendan emplear postlarvas y alevinos en las pruebas de toxicidad o bioensayos (Larraín, 1995; Environment Canadá, 1992). En este estudio se evaluó el grado de letalidad del insecticida Fipronil sobre los individuos de “Gamitana” en dos estadíos tempranos de su ciclo de vida, postlarva y alevín¹. Los criterios a tener en cuenta para selección del organismo-prueba para la realización de las pruebas de toxicidad, incluyen: disponibilidad de individuos, la capacidad de la especie a ser mantenida bajo condiciones de laboratorio, tamaño adecuado para la manipulación, conocimiento de la biología de la especie, incluyendo el comportamiento, hábitos alimenticios, ecología, ciclo reproductivo, desarrollo y ciclo de vida, así como importancia ecológica y de valor económico (Reish y Oshida, 1987).

Para elaborar el diseño experimental de este estudio fue de suma importancia conocer la biología de la especie, en especial, su ciclo de vida, pues es en base a este criterio que se expuso durante 48 horas al insecticida Fipronil a los organismos en estadío de postlarva, ya que es sabido que en este estadío estos organismos todavía no han completado el desarrollo de sus principales sistemas y órganos (Woynarovich y Woynarovich, 1998) y serían rápidamente afectados por el efecto tóxico del insecticida. En cambio, para los organismos en estadío de alevín, fue necesario exponerlos durante 96 horas al insecticida Fipronil, puesto que los organismos en este estadío presentan sus sistemas y órganos completamente desarrollados (Woynarovich y Woynarovich, 1998) lo que haría suponer que adquirieron una mayor resistencia, entonces un mayor tiempo de exposición al insecticida en la prueba final sería lo más

¹ En estos estadíos de vida los organismos son más sensibles a los contaminantes. Además, los bioensayos con peces adultos proveen poca información sobre el efecto de los contaminantes en el ambiente acuático, al existir la posibilidad de que estos ya estén adaptados a un medio adverso.

lógico. Es por todo lo anterior que, esta investigación siguió las recomendaciones de las diferentes guías y manuales sobre bioensayos o pruebas de toxicidad aguda, que establecen conocer la biología de los organismos-prueba (Braunbeck y Lammer, 2006; OECD, 1992; Reish y Oshida, 1987).

Este trabajo de investigación muestra la manera correcta de establecer el rango de concentraciones que se emplean en las pruebas finales y una forma de determinar la mayor concentración que no causa letalidad en los organismos de tal manera, se llevaron a cabo varias pruebas preliminares o “*screening test*” para cada estadio de vida evaluado. De acuerdo con las investigaciones de Cella (2009) y Gómez-Manrique (2009), estos autores dan mucha importancia a las pruebas preliminares, puesto que son cruciales para determinar el rango de concentraciones a emplear en las pruebas finales.

En las pruebas finales se observó una disminución de la mortalidad después de las 24 horas de exposición, pero no se realizó el recambio de agua, puesto que las pruebas fueron del tipo estáticas, es decir se efectúa con la misma solución durante todo el tiempo que dure la prueba (Sánchez y Vera, 2001). Cella, 2009, también resalta que el mayor porcentaje de mortalidad de *P. mesopotamicus* fue dentro de las primeras 24 horas de exposición al insecticida Fipronil.

Las pruebas preliminares realizadas en este estudio se iniciaron con un amplio rango de concentraciones (progresión geométrica), para después disminuir poco a poco y emplear una progresión aritmética en la prueba final para los organismos en estadio de postlarva. Las pruebas preliminares para los organismos en estadio de alevín las iniciamos basándonos en el dato de la CL_{50-48h} (0.217mg.L^{-1}), calculado para el estadio de postlarva, pero no conseguimos determinar una concentración que cause el 100% de mortalidad de los organismos, por lo que, se empleó una progresión geométrica en la siguiente prueba preliminar, con lo que se obtuvo las dos concentraciones extremas. Según Sánchez y Vera (2001), las pruebas de toxicidad se

inician con un rango amplio de concentraciones (progresión logarítmica, geométrica), donde deben existir concentraciones que causen 100% de mortalidad y el 100% de sobrevivencia de los individuos (valores extremos) y una vez ya establecido el rango preliminar, se puede emplear un rango aritmético, para las pruebas finales definitivas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los estadíos tempranos del ciclo de vida de *C. macropomum* son sensibles al ser expuestos a el insecticida Fipronil, puesto que presentó un CL_{50-48h} de 0.217 mg.L^{-1} para el estadío de postlarva y un CL_{50-96h} de 0.326 mg.L^{-1} para el estadío de alevín. Los investigadores Helfrich et al. (2009) y Zucker (1985) han clasificado la toxicidad aguda en base a su potencial tóxico, de esta manera y en base a los resultados obtenidos en esta investigación es posible clasificar al Fipronil como un insecticida de alta toxicidad o altamente toxico para los estadíos de postlarva y alevín, de *C. macropomum*.

Comparando las concentraciones letales medias determinadas en el presente estudio con respecto a otros estudios (Chandler et al. 2004; Cella et al. 2009; Gómez-Manrique 2009; Nikolov; Miladenova, 1975; Schlenk et al. 2001; Stark et al. 2005; USEPA 1996; 2000) se puede establecer el siguiente orden de sensibilidad relativa: *Amphiascus tenuiremis* > *Daphnia pulex* > *Ceriodaphnia dubia* > *Selenastrum capricornutum* > *Poecilia reticulata* > *Lepomis macrochirus* > *Daphnia magna* > *Navícula pelliculosa* > *Skeletonema costatum* > *Procambarus clarkii* > *Oncorhynchus mykiss* > *Colossoma macropomum* > *Danio rerio* > *Ictalurus punctatus* > *Piaractus mesopotamicus*. Se observó que *C. macropomum*, es más sensible al ser comparado con otros peces como *Piaractus mesopotamicus*, *Ictalurus punctatus* y *Danio rerio*, 3.70, 1.99 y 1.21 veces más sensible respectivamente, pero en comparación con *O. mykiss*, *Lepomis macrochirus* y *Poecilia reticulata*, *C. macropomum* resulta ser 0.88, 0.30 y 0.28 veces menos sensible (cuadro 26). De la misma manera *C. macropomum* se mostró menos sensible que el crustáceo *Procambarus clarkii* (0.51 veces), y menos sensible que los microcrustáceos *Daphnia magna* (0.36 veces), *Ceriodaphnia dubia*

(0.06 veces), *Daphnia pulex* (0.056 veces) y *Amphiascus tenuiremis* (0.024 veces), respectivamente (cuadro 26). Además, *C. macropomum* resulto ser menos sensible que las microalgas *Skeletonema costatum* (0.498 veces), *Navícula pelliculosa* (0.427 veces), *Selenastrum capricornutum* (0.270) (cuadro 26).

Las diferencias en la sensibilidad de los organismos podría deberse a caracteres fisiológicos de cada especie empleada en las pruebas de toxicidad, el estadio de vida de los organismos y los parámetros físico-químicos que fueron empleados en las distintas pruebas, puesto que una variación significativa en los parámetros puede influenciar en el modo de acción del tóxico, pudiendo acelerar o retardar su biodegradación.

Cuadro 24. Valores de CL50 para diversos organismos expuestos al Fipronil

	ESPECIE	TIEMPO (horas)	CL50 (mg.L ⁻¹)	REFERENCIA
Algas	<i>Selenastrum capricornutum</i>	120	0.076	USEPA. 2000
	<i>Skeletonema costatum</i>	120	0.14	USEPA. 2000
	<i>Navícula pelliculosa</i>	120	0.12	USEPA. 2000
Invertebrados	<i>Daphnia magna</i>	48	0.1	USEPA. 2000
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48	0.0175	Nikolov;Miladenova (1975)
	<i>Procambarus clarkii</i>	96	0.143	Schlenk et. al, (2001)
	<i>Amphiascus tenuiremis</i>	96	0.0068	Chandler et, al. (2004)
	<i>Daphnia pulex</i>	96	0.016	Stark et, al. (2005)
	<i>Ictalurus punctatus</i>	96	0.56	USEPA. 2000
Peces	<i>Lepomis macrochirus</i>	96	0.083	USEPA. 2000
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96	0.246	USEPA. 1996
	<i>Poecilia reticulata</i>	96	0.08	Gómez-Manrique, (2009)
	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	96	1.04	Cella, (2009)
	<i>Danio rerio</i>	96	0.34	Cella, (2009)
	<i>Colossoma macropomum</i> *	96	0.331	Este estudio
	<i>Colossoma macropomum</i> **	48	0.217	Este estudio

*Organismos en estadio de alevín

**Organismos en estadio de postlarva

8.- CONCLUSIONES

- El insecticida Fipronil es altamente tóxico para los estadíos de postlarva y alevín de “Gamitana” (*C. macropomum*).
- Las concentraciones máximas no letales empleando postlarvas y alevinos de “Gamitana” (*C. macropomum*) para el insecticida Fipronil fueron de 0.12 mg.L⁻¹ (t=48h) y 0.22 mg.L⁻¹ (t=96h) respectivamente.
- La concentración letal media (CL50-48h) para postlarvas de “Gamitana” (*C. macropomum*) expuestas al insecticida Fipronil fue de 0.217 mg.L⁻¹.
- La concentración letal media (CL50-96h) para alevinos de “Gamitana” (*C. macropomum*) expuestos al insecticida Fipronil fue de 0.326 mg.L⁻¹.
- La “Gamitana” (*C. macropomum*) en sus estadíos de postlarva y alevín demostró ser un adecuado organismo-prueba para evaluar la calidad de agua, ya que resultaron ser sensibles al insecticida Fipronil.
- Los individuos de “Gamitana” (*C. macropomum*) en estadio de alevín, demostraron ser ligeramente más tolerantes al insecticida Fipronil, en comparación a los individuos en estadio de postlarva.

9.- RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de toxicidad crónicas, con la finalidad de evaluar efectos sub-letales a nivel de órganos o tejidos en los organismos, como por ejemplo, tasa de crecimiento, tasa reproducción, estrés oxidativo, expresión de genes, etc.
- Evaluar el efecto letal o sub-letal de otros compuestos químicos en la “Gamitana” (*C. macropomum*), en especial de aquellos compuestos de los cuales no se tiene algún reporte o información.
- Controlar los parámetros físico-químicos durante los bioensayos o pruebas de toxicidad, para que la mortalidad de los organismos-prueba no sea vea afectada por la variación brusca de alguno de los parámetros.
- Emplear un mayor número de réplicas en los bioensayos o pruebas de toxicidad para reducir el margen de error en los resultados.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALCAZAR, F. Documento guía del Curso Regional CPPS/PNUMA/COI, sobre Bioensayos y pruebas de toxicidad e organismos marinos del Pacífico Sudeste. Cartagena - Colombia. 1988. pp.162
- ALAYO, M. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, diesel 2 y diesel 6, para la evaluación comparativa de dos subespecies del rotífero *Brachionus plicatilis* MÜLLER, 1796. Asesor: José Iannacone. Tesis Título de Licenciado. UNFV. E.A.P. Biología. Lima, 2002.
- ÁLVAREZ G. et al. 2008. Efecto de la temperatura y densidad sobre el peso y talla final de alevinos de “Gamitana” *Colossoma macropomum* bajo condiciones controladas con dos tipos de alimento. En: XVII Reunión Científica ICBAR. Lima. UNMSM.
- ANUNOBI, C.; E. UFODIKE; L. CHUDE. Lethal effects of the detergent, Elephant Blue ® on the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) Journal of Aquatic Sciences. 2002, vol.17, nº 1, p. 95-97.
- APHA 1989. Standard Methods for the Examination of water, wastewater and sediments. 17th Ed. American Public Association, Washington, D.C. U.S.A.
- ARAUJO, C.; M. GOULDING. 1998. Os Frutos do Tambaqui. Ecologia, Conservação e Cultivo na Amazonas. Sociedade Civil Mamiraua. MCT-CNPQ. Brasília.186 Pp.
- BALANÇA, G.; M. DE VISSCHER. Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 1997, vol. 32, nº 1, p.58–62.
- BALINOVA, A. M.; MONDESKY, M. Pesticide contamination of ground and surface water in Bulgarian Danube plain. Journal of Environment Science Health., 1999. v.34, p.33-46.

- BLAISE, C.; N. BERMINGHAM; R. Van COILLIE. The integrated ecotoxicological approach to assessment of ecotoxicity. Water quality bulletin. 1985, vol.10, nº 1, p.3-7.
- BOBÉ, A.; J. COOPER; C. COSTE; M. MULLER. Behaviour of Fipronil in soil under Sahelian Plain field conditions. Pesticide Science, 1998. vol. 52, nº 3, p.275-281.
- BRAUNBECK, T; E. LAMMER. Fish Embryo Toxicity Assays. German Federal Environment Agency. UBA Contact Number 203 85 422. 2006. Pp. 40
- BROWN, C.D. et al. Movement of pesticides to surface water from a heavy clay soil. Pesticide Science. 1995. v. 43, n. 2, p. 131-140.
- BUHL, K. J.; S. J. HAMILTON. Acute toxicity of fire-control chemicals, nitrogenous chemicals, and surfactants to rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society. 2000, vol.129, nº 2, p. 408-418.
- BUSER, H. R. Atrazine and others s-triazine herbicides in lakes and in rains in Switzerland. Environment Science Technology. 1990. v.24, p.1049-1058,
- CASTILLO, G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicación. IMTA. 1ed. México. 2004. pp. 189
- CARBONETTO, G. Fipronil. Pesticides News. 2004, vol. 48 nº 1, p. 20.
- CELLA, A. L. Ecotoxicologia do agrotóxico Fipronil em pcu (*Piaractus mesopotamicus* Holmerg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de plaguicidas na bacia do rio Corumbataí. Orientador: Valdemar Luiz Tornisielo. Tese título de Doutor em Ciências. UNESP. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba. São Paulo - Brasil. 2009.
- CHANDLER, G. T. et al. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. Environmental Toxicology and Chemistry. 2004. vol. 23, nº1, p.117–124.

- CHÁVEZ, C. A. "Impactos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818: CL50, crescimento e hematologia". Orientador: Adalberto Luis Val. Tese de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidad Federal do Amazonas, Manaus-Amazonas. 2006.
- CHAPADENSE, P.F.G et al. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2009, vol.10, nº.2, p.398-405.
- CHU-KOO, F.; J. ALVÁN. "Resultados preliminares del uso del alimento extrusado en la alimentación de la Gamitana (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*). En 2º Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima, Perú, 22-24 de Noviembre 2006.
- CORTES, H. Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. Monografía. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. 2011.
- CRITES, R.; TCHOBANOGLIOUS, G. (2000): Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones, Colombia. Mc Graw Hill.
- DIALLO, A.; M. DIAGNE; K. NDOUR; J. LAHR. Laboratory toxicity tests with eight acridicides on *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae), En: Everts, J., Mbaye, D., Barry, O. and Mullie, W. (eds.) Environmental side-effects of locust and grasshopper control, Dakar, Senegal, 1998, vol.3, 188-204, LOCUSTOX Project – GCP/SEN/041/NET, FAO,
- DUEÑAS, F. Estudio de la susceptibilidad de las postlarvas *Penaeus vannamei* a los pesticidas Tilt y Calixin. Asesor: Ing. Ann Van Hauwaert. Tesis Título de Grado. ESPO. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil. Ecuador. 1998.
- DORES, E. F. G. C Contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em Primavera do Leste, Mato Grosso. 2005. 282 f, Tese (Doutorado em química). Universidade Estadual Paulista. Araraquara-SP. 2005.

- ESCLAPÉS, M. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP. 1999. Pp: 213
- FAO. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4a. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. Pesca. 1981. Vol.164. pp. 34.
- GOLDSTEIN, E.G; P. A. ZAGATTO; R. P. A ARAUJO; E. BERTOLETTI. Avaliação da toxicidade dos principais despejos indústrias de região de ERQ-Suzano, traves de ensaios biológicos. Revista DAE. 1983, vol.132, p. 42-47.
- GÓMEZ-MANRIQUE, W. Toxicidade aguda, risco ambiental do Fipronil para o guarú (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto. Tese título de Mestre em Aqüicultura. UNESP. Centro de Aqüicultura. Jaboticabal. São Paulo - Brasil. 2009
- GÓMEZ-MANRIQUE, W y N. GONCALVES MACHADO-NETO. Toxicidad aguda y riesgo ambiental del Fipronil para guppy (*Poecilia reticulata*). En: I Congreso Peruano de Ecotoxicología y Química Ambiental. Universidad Ricardo Palma. Surco-Perú. 12-14 de Noviembre 2008.
- GRANT, D.; J. BLOOMQUIST; H. AYAD; A. CHALMERS. A comparison of mammalian and insect GABA receptor chloride channels. Pesticide Science. 1990, vol. 30, p. 355-356.
- GOULDING, M. The fishes and the forest, explorations in Amazonian natural history. Rivers, floodplains and flooded forest of the Amazon. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California. University of California Press, Ltd. London, England. 1980. v.1. p. 10-27
- GOULDING, M. The fishes and the forest: Explorations in Amazonas natural history. 1ra Edition. Universidad of California. Longman Press. 1982, p. 350. ISBN-13: 978-0520041318
- HAINZL, D. and J.E CASIDA. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. Proceedings of the National. Academy of Science of the USA. 1996, vol.93, p.12764 –12767.

- HAMON, N.; R. SHAW; H. YANG. Worldwide Development of Fipronil Insecticide. Herzog, G., Hardee, D., Ottens, R., Ireland, C. y Nelms, J. (Eds.) In: Proceedings Beltwide Cotton Conferences US. 1996, vol. 2, p. 759-765.
- HASSET, J.P; LEE, G.F. Modeling of pesticides in the aqueous environment. In: DORES, E.F.G.C. Contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em Primavera do Leste, Mato Grosso. 2005. 282 f, Tese (Doutorado em química). Universidade Estadual Paulista. Araraquara-SP.2005.
- HELFRICH, L.A. et al. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. Virginia Polytechnic Institute and State University. Publication 420-013. 2009. Pp. 24.
- IANNACONE, J; L. ALVARIÑO. Ecotoxicidad Aguda del Zinc sobre el "guppy" *Poecilia reticulata*. Wiñay Yachay. 1997, vol. 2, nº 3, p 63-73.
- JURY, W. A.; WINER, A. M.; SPENCER, W. F.; FOCHT, D. D. Transport and transformation of organic chemicals in the soil-air-water ecosystem. Rev. Environment Contamination Toxicology., v.99, p.119, 1987.
- KIDD, H; JAMES, D. The agrochemicals handbook. 3th ed. Cambridge. Royal Society of Chemistry Information Services. 1991. ISBN: 0-85186-464-3.
- LAHR, A.; A. BADJI; K. NDOUR; D. DIALLO, Acute toxicity tests with *Streptocephalus sudanicus* (Branchipoda, Anostraca) and *Anisops sardeus* (Hemiptera, Notonectidae) using insecticides for Desert Locust control. Everts, J. Mbaye, D., Barry, O. y Mullie, W. (eds.) In: Environmental side-effects of locust and grasshopper control. Dakar, Senegal. 1998, vol. 3, p. 39-57 LOCUSTOX Project – GCP/SEN/041/NET, FAO.
- LARRAÍN, A. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Ciencia y Tecnología Marina. CONAMA. 1995. Chile (Nº especial), p. 39-47.
- LEONARD, R.A. Herbicides in surface Waters. En: GROVER, R. Environmental chemistry of herbicides. Boca Raton: CRC Press, 1989. V1, p. 45-87.

- MALAGRINO, W.; A. ALMEIDA. Estudo comparativo de ação tóxica de um detergente biodegradável sobre *Poecilia reticulata* e *Poecilia vivípara* (Pises: Poecilidade). Revista DAE. 1987. Vol.148, nº 47, p. 86-91.
- NAKAGOME, F. K.; J. A. NOLDIN; Jr. C. RESGALLA. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente. 2006, Curitiba, vol. 16, p. 93-100,
- NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G.M & PETROCELLI, S.R, (Ed). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, New York: Hemisphere. 1985, p. 335 – 373.
- OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS (210). Fish Early-life Stage Toxicity Test. 1992. Pp. 20
- OLIVEIRA, C. P. F. Efeito de dois metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da provincial petroleira de Urucum sobre “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Cuvier,1818). Tese de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas. Universidade Federal do Amazonas, Manaus- Amazonas. 2003, p 67.
- PEVELING, R. Toxicity of fungal and chemical locust control agents to lizards. Advances in Applied Acridology. AAAI, University of Wyoming, US. 2000, vol.17.
- RAMIREZ, P.; A. MENDOZA. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Impresora y Encuadernadora S. A., México D.F. 2008, 1ra Edic. p 407.
- RAZMAH, G.; A. SALMIYA. Biodegradability and Ecotoxicity of Palm Stearin-Based Methyl Ester Sulphonates. Journal of Oil Palm Research. June 2004, vol.16, nº1, p. 39-44.
- REISH, D.; P. OSHIDA. Manual of methods in aquatic environment research. Part 10 – Short-term static bioassays. FAO. Roma – Italia. 1987. 62 pp.

- RODRÍGUEZ, J.; M. ESCLAPÉS. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. PDVSA. Venezuela. 1995. Pp: 109.
- SÁNCHEZ, G.; G. VERA. Manual Introductorio de Ecotoxicología Acuática. Informe Instituto del Mar del Perú. Junio 2001, n° 161, p. 40.
- SEGNINI DE BRAVO M. I. et al. Efectos del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-s-triazina, sobre algunos tejidos de *Colossoma macropomum* Cuvier 1818 (PISCES: CHARACIDAE). Boletín del Instituto de Oceanografía. Universidad de Oriente. Venezuela. 2005, vol. 44, n° 1, p. 51-57.
- SOLOMON, K. R. Avaliação de riscos ecotoxicológicos dos produtos fitossanitários. Relatório técnico. Centro de Toxicologia. Universidade de Guelph, Canadá. 1996. 52p.
- STARK, D. J; I. R.VARGAS. Toxicity and hazard assessment of Fipronil to *Daphnia pulex*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2005, vol. 62, n° 1 p.11–16.
- STEVENS, M.M.; S.S. HELLIWELL; G. N. WARREN. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. Field Crops Research. 1998, vol. 57, n° 2, p.195–207.
- STEHR, C.M; T.L. LINBO; J.P. INCARDONA; N. L SCHOLZ. The developmental neurotoxicity of Fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. Toxicological Sciences. 2006, vol. 92, n° 1, p. 270-278.
- TSAI, C; J. MCKEE. Acute toxicity to goldfish of mixtures of chloramines, copper and linear alkylate sulfonate. Transactions of the American Fisheries Society. 1980, vol.109, n° 1, p.132-141.
- USEPA, OFFICE OF PREVENTION, PESTICIDES AND TOXIC SUBSTANCES, US. Fipronil for use on Rice (Regent, Icon) and Pets (Frontline), HED Risk Assessment, Chemical 129121, Barcodes D242090, D245656, D245627, &

D241676, Cases 288765, 031271, 060305, & 061662, Submissions S535772, S541670, S541551, S534929. 2000. USEPA Washington DC, p. 90.

USEPA. Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S. EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington DC. 1996, p.1-10.

VARELA R. A. Determinación del nivel de toxicidad aguda del fungicida carbendazim y el herbicida 2,4 d mediante bioensayos con *Galaxias maculatus*. Asesor: Dr. Francisco Encina Montoya. Tesis Grado de Licenciado en Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco. Escuela de Ciencias Biológicas y Químicas. Temuco-Chile. 2005, p. 65.

VARGAS G. et, al. Efecto de la temperatura y frecuencia alimenticia sobre el crecimiento de alevinos de *Colossoma macropomum* "Gamitana" en condiciones controladas. En: XVII Reunión Científica ICBAR. UNMSM. Lima, Perú. 12-15 Agosto 2008.

VERA, G.; J. TAM; V. VERA; E. PINTO. Pruebas Ecotoxicológicas con cadmio y cromo usando postlarvas de pejerrey *Odontesthes (Austromenidia) regia regia* HILDEBRAND. Revista Peruana de Biología. UNMSM. 2001, vol. 8 nº 2, p.125-135.

VILLAMAR, F. Bioensayo de toxicidad (CL50) del dispersante de petróleo BP 1100 WD, con fitoplancton marino (*Tetraselmis sp*). Acta Oceanográfica del Pacífico. INDOCAR, Ecuador. 1996. vol. 8(1): 67-73

WALKER, C.H. et al. Principles of Ecotoxicology. CRC Taylor y Francis. 3st ed. 1996. 321 pp.

WOYNAROVICH, A; E. WOYNAROVICH. Reproducción Artificial de las Especies *Colossoma* y *Piaractus*: Una Guía detallada para la Producción de Gamitana, Paco y Caraña. Editorial Taller. Publicación del FONDEPES. Lima. 1998, p.102.

ZAE, J.H. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 1999.

ZHAO, J.Z.; WU S.C.; ZHU, G. R. Bioassays with recommended field concentrations of several insecticides for resistance monitoring in *Plutella xylostella*. Resistant Pest. Management. 1995, vol.7, nº 1, p.13–14.

ZUCKER, E. Standard Evaluation Procedure Acute toxicity test for freshwater fish. Washington: Hazard Evaluation Division of USEPA. 1985 (USEPA Publication 540/9-85-006).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ELECTRÓNICAS:

ENVIRONMENT CANADA, 1992. Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). 335 River Road, Ottawa, Ontario: Richard Scroggins. Second Edition. July 1998. Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28. p. 96. [ref. de 20 de octubre del 2010]. Disponible en Web: <https://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/25737CD7-B92B-48C7-AF60-46115D7CC415/RM28-2ndEnglishFinal%20-%20U.pdf>

MOREA, L. Análisis del procedimiento para la determinación de la DL50 (Dosis Letal Media) a través del método Probit en un bioensayo. 1997. [ref. de 15 de julio del 2010]. Disponible en Web: www.monografias.com/trabajos14/dosis-letal/dosis-letal.shtml

PEÑA, C; E. CARTER y F. AYALA. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. A Superfund Basic Research and Training Program at the College of Pharmacy. The University of Arizona Publications. 2001, p.203. [ref. de 15 de enero del 2010]. Disponible: <http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/toxamb.pdf>

ANEXOS

ANEXO N°1.- Valores de mortalidad de postlarvas de *C. macropomum* transcurridas 48 horas de exposición al Fipronil

Tratamientos (mg.L ⁻¹)	Repeticiones	24 h	48 h	Acumulado	Mortalidad (%)
0.30	1	9	1	10	100
0.30	1	9	1	10	100
0.30	1	8	2	10	100
0.30	1	7	3	10	100
0.255	2	7	1	8	80
0.255	2	6	3	9	90
0.255	2	5	4	9	90
0.255	2	5	2	7	70
0.21	3	2	3	5	50
0.21	3	2	3	5	50
0.21	3	1	1	2	20
0.21	3	0	2	2	20
0.165	4	1	1	2	20
0.165	4	0	0	0	0
0.165	4	1	0	1	10
0.165	4	0	0	0	0
0.12	5	0	0	0	0
0.12	5	0	0	0	0
0.12	5	0	0	0	0
0.12	5	0	0	0	0

**ANEXO N°2.- Valores de mortalidad de alevinos de *C. macropomum*
transcurridas 96 horas de exposición al Fipronil**

Tratamientos (mg.L⁻¹)	Repeticiones	24 h	48 h	72 h	96 h	Acumulado	Mortalidad (%)
0.54	1	9	1	0	0	10	100
0.54	1	10	0	0	0	10	100
0.54	1	9	1	0	0	10	100
0.432	2	9	0	0	0	9	90
0.432	2	9	0	0	0	9	90
0.432	2	9	0	0	0	9	90
0.346	3	3	3	0	0	6	60
0.346	3	3	2	0	0	5	50
0.346	3	3	3	0	0	6	60
0.276	4	3	0	0	0	3	30
0.276	4	2	0	0	0	2	20
0.276	4	1	1	0	0	2	20
0.221	5	0	0	0	0	0	0
0.221	5	0	0	0	0	0	0
0.221	5	0	0	0	0	0	0

ANEXO N°3.- Insecticida REGENT SC (I.A. FIPRONIL=200 mg.L⁻¹) empleado en las pruebas de toxicidad aguda

